

Experimentelle Untersuchungen
zur Wirkung von Aktivatoren des
Peroxisomenproliferator-aktivierten Rezeptor α
auf das hepatische Genexpressionsprofil
und die Zusammensetzung der Milch bei Sauen

Birthe Gröne



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. K. Eder

**Experimentelle Untersuchungen
zur Wirkung von Aktivatoren des
Peroxisomenproliferator-aktivierten Rezeptor α
auf das hepatische Genexpressionsprofil
und die Zusammensetzung der Milch bei Sauen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Birthe Gröne

Tierärztin aus Saarbrücken

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Eder

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

Tag der Disputation: 02.12.2014

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Bochum, den 14.06.2014

Birthe Gröne

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	X
II	Abbildungsverzeichnis	XIV
III	Tabellenverzeichnis	XV
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Laktation	2
2.1.1	Allgemeines zur Laktation und Fakten zur Laktation der Sau	2
2.1.2	Anpassungsmechanismen während der Laktation	3
2.2	Der Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptor α (PPARα)	4
2.2.1	Aufbau des PPAR α und der Ablauf seiner Signalkaskade	4
2.2.2	Die Bedeutung des PPAR α für die Laktation	7
2.3	Laktationsbedingte Veränderungen im Immunsystem	7
2.3.1	Aufbau des NF- κ B und Ablauf seiner Signalkaskade	8
2.3.2	Aufbau und Ablauf der Signalkaskade des Nrf2	10
2.3.3	Interaktion zwischen NF- κ B und Nrf2	13
2.3.4	Wirkung des PPAR α im Entzündungsgeschehen	14
2.4	Sterol Regulatory Element Binding Proteins	15
2.5	Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) und die <i>Unfolded Protein Response</i> (UPR)	18
2.5.1	Regulationsmechanismen der UPR	18
2.5.2	Möglichkeit der Beeinflussung des ER-Stresses durch PPAR α	24
2.6	Das Ubiquitin-Proteasom-System	24
2.6.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System im Verlauf des Muskelabbaus	24
2.6.2	Interaktion von PPAR α und UPS	26
3	Zielstellung	28
4	Material und Methoden	30
4.1	Versuch 1	30
4.1.1	Versuchstiere und ihre Haltung	30
4.1.2	Fütterung	31

4.2	Versuch 2	33
4.2.1	Versuchstiere und ihre Haltung	33
4.2.2	Fütterung	33
4.3	Probengewinnung	37
4.4	Material	39
4.5	Methoden	44
4.5.1	Charakterisierung der Milch	44
4.5.2	Vitamin A- und Vitamin E-Konzentration in Milch und Futter	46
4.5.3	Bestimmung des Fettsäuremusters in Milch und Futter	49
4.5.4	Bestimmung von L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, γ -Butyrobetain und Trimethyllysin im Plasma und Milch	52
4.5.5	Bestimmung der Menge an freien Fettsäuren im Plasma	55
4.5.6	Bestimmung der Enzymaktivität der Glutathion-Peroxidase (GPX) im Plasma	56
4.5.7	Genexpressionsanalyse	57
4.6	Statistik	66
5	Ergebnisse	67
5.1	Ergebnisse aus Versuch 1 zur Untersuchung laktationsbedingter Veränderungen	67
5.1.1	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	67
5.2	Ergebnisse aus Versuch 2 zur Untersuchung der Auswirkungen der Behandlungen mit Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion	72
5.2.1	Gewichtsentwicklung, Futteraufnahme und Energiebalance der Sauen	72
5.2.2	Gewichtsentwicklung der Ferkel	73
5.2.3	Zusammensetzung der Sauenmilch	74
5.2.4	Biochemische Parameter im Plasma	79
5.2.5	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	81
6	Diskussion	94
6.1	Einfluss der Laktation auf ausgewählte Stoffwechselwege	94
6.1.1	Einfluss der Laktation auf Gene des Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsels	95
6.1.2	Einfluss der Laktation auf Gene des Muskelabbaus	96

6. 1. 3	Einfluss der Laktation auf Gene der UPR	97
6. 2	Einfluss der Behandlungen durch Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion während der Laktation	98
6. 2. 1	Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf die Energiebilanz und Gewichtsentwicklung der Sauen	98
6. 2. 2	Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Zielgene des PPAR α	99
6. 2. 3	Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Gene des Carnitinstoffwechsels	102
6. 2. 4	Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Gene des Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsel	104
6. 2. 5	Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Gene des Muskelabbaus	106
6. 2. 6	Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Gene des Entzündungsgeschehens und der antioxidativen Abwehr	107
6. 2. 7	Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Gene der UPR	111
6. 2. 8	Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf die Zusammensetzung der Milch	112
7	Fazit	115
8	Zusammenfassung	117
9	Summary	119
10	Literaturverzeichnis	121
11	Danksagung	154

I Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ACACA	Acetyl-CoA Carboxylase α
ACOX1	Acyl-CoA-Oxidase
ACTB	β-Actin
ALDH9A1	Aldehyd-Dehydrogenase 9A1 (TMABADH)
ATP5G1	ATP-synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9)
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1
BAX	BCL2-associated X protein
BBOX1	Butyrobetaine (γ), 2-oxoglutarate dioxygenase (gamma-butyrobetaine hydroxylase) 1
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BHT	Butylhydroxtoluol (Butylated Hydroxytoluene)
bp	Basenpaare
CASP3	Caspase 3 (apoptosis-related cysteine peptidase)
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2 (MCP-1)
CD36	CD36 Molekül (Thrombospondin-Rezeptor) (FAT)
cm	Zentrimeter
CoA	Coenzym A
CPT1	Carnitin-Palmitoyltransferase 1
C _t	Cycle threshold
CYP1A1	Cytochrome P450 1A1
CYP4A24	Cytochrom P450, Familie 4, Subfamilie A, Polypeptid 24
d	Tag
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3 (CHOP)
dest.	destilliert
df	Filmdicke
DNA	Desoxyribonuclein acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNAJC3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3 (P58 ^{IPK})
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-behandeltes Reinstwasser
EDEM-1	ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-1

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Emissionswellenlänge
EX	Exzitationswellenlänge, Anregungswellenlänge
Fa.	Firma
FABP	Fatty acid binding protein
FAME	Fatty acids methylester
FASN	Fatty acid synthase
FBXO32	F-box Protein 32 (Atrogin)
FGF21	Fibroblast growth factor 21
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GfE	Gesellschaft für Ernährungsphysiologie
GPAT	Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase
GPX1	Glutathion-Peroxidase 1
GSR	Glutathion-S-Reduktase
H ⁺	Proton
H ₂	Wasserstoff
He	Helium
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase
HMOX1	Hämoxygenase 1
HP	Haptoglobin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie - high performance liquid chromatography
HSP90B1	Heat shock protein 90kDa beta, member 1 (glucose-regulated protein, 94kDa) (GRP94)
HSPA5	Heat shock 70kDa protein A5 (glucose-regulated protein, 78kDa) (GRP78)
Hz	Hertz
I. E.	Internationale Einheiten
ICAM1	Intercellular adhesion molecule-1
ID	Innendurchmesser
IL1B	Interleukin 1β
IL6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
JLU	Justus-Liebig Universität Gießen
kg	Kilogramm

LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LDLR	Low density lipoprotein-Receptor
LM	Lebendmasse
LPL	Lipoproteinlipase
ME	metabolisierbare Energie, umsetzbare Energie
mg	Milligramm
min	Minute
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MVK	Mevalonatkinase
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NQO1	NAD(P)H-Dehydrogenase, quinone 1
pcv	praecaecal verdaulich
PDIA4	Protein-Disulfide-Isomerase, family A, member 4
PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A (GADD34)
PRDX6	Peroxiredoxin 6
PSMA1	Proteasome subunit, alpha type-1
PSMB1	Proteasome subunit, beta type-1
PTGS2	Prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase (prostaglandin-endoperoxide synthase 2) (COX-2)
qPCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
RNA	Ribonuclein acid, Ribonucleinsäuren
RPS9	40S ribosomal protein S9-like
SAA2	Serum amyloid A2
SCD	Stearoyl-CoA-Desaturase (δ -9-Desaturase)
SD	Standardabweichung
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A
sec	Sekunde
SHAS2	Hyaluronan synthase 2
SLC22A5	Solute carrier family 22 (organic cation/ carnitine transporter), member 5
SLC27A1	Solute carrier familiy 27 (Fatty acid transporter, FATP)
SOD1	Superoxide dismutase 1
SREBF	Sterol regulatory element binding transcription factor

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TMLHE	Trimethyllysine dioxygenase, (mitochondrial-like)
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TP53	Tumor Protein 53
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIM63	Tripartite Motif Containing 63, E3 ubiquitin protein ligase (MuRF-1)
TXNRD1	Thioredoxinreduktase 1
U/min	Umdrehungen pro Minute
UBB	Ubiquitin B
UBE2B	Ubiquitin-conjugating enzyme E2B (E2 _{14k})
UCP3	Uncoupling Protein 3
USP	United States Pharmacopeia, Maßsystem für Fadenstärke
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vit.	Vitamin

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Genexpression durch PPAR α	6
Abbildung 2: Prinzip der Genexpression durch NF- κ B	9
Abbildung 3: Prinzip der Genexpression durch Nrf2	12
Abbildung 4: Prinzip der Genexpression durch SREBPs	16
Abbildung 5a/b: Prinzip der Reaktionen auf ER-Stress	22/23
Abbildung 6: Chromatogramme der HPLC zur Ermittlung der Vitamin E- und Vitamin A-Konzentrationen	49
Abbildung 7: Chromatogramm des FAME-Standards.	52

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Futterrationen von Versuch 1 _____	32
Tabelle 2: Übersicht über die Fütterung der Gruppen in Versuch 2 _____	34
Tabelle 3: Zusammensetzung des Laktationsfutters (Kontrollfutter) in Versuch 2 _____	35
Tabelle 4: Gehalte an Tocopherolen in den Futterrationen in Versuch 2 _____	36
Tabelle 5: Fettsäuremuster (g/100g Fettsäuren) der Futterrationen in Versuch 2 _____	36
Tabelle 6: Reagenzien zur Bestimmung des Rohfettgehaltes _____	39
Tabelle 7: Reagenzien zur Bestimmung des Rohproteingehaltes _____	39
Tabelle 8: Reagenzien zur Bestimmung des Laktosegehaltes _____	39
Tabelle 9: Reagenzien zur Bestimmung der Vitamin E- und Vitamin A-Konzentration ____	40
Tabelle 10: Reagenzien zur Bestimmung des Fettsäuremusters _____	40
Tabelle 11: Reagenzien zur Bestimmung des Gehalts an Carnitin und dessen Vorstufen __	40
Tabelle 12: Reagenzien zur Bestimmung der freien Fettsäuren _____	41
Tabelle 13: Reagenzien zur Bestimmung der Enzymaktivität von Glutathionperoxidase __	41
Tabelle 14: Reagenzien der Genexpressionsanalyse _____	42
Tabelle 15: Verwendete Puffer und Lösungen _____	43
Tabelle 16: Verwendete Geräte der Fa. Hitachi/VWR (Darmstadt, Deutschland) zur Analyse der Konzentrationen an Vitamin A und E via HPLC _____	47
Tabelle 17: Einstellungen des FL-Detektors mit vorgenommener Wellenlängenschaltung und Retentionszeiten zur Ermittlung der Konzentrationen an Vitamin A und E ____	47
Tabelle 18: Kalibrationsbereiche zur Analyse der Konzentrationen an Vitamin A und E mittels HPLC _____	48
Tabelle 19: Verwendete Geräte und Einstellungen zur Analyse des Fettsäuremusters via Gaschromatographie _____	51
Tabelle 20: Geräte zur Analyse der Konzentrationen an L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, Trimethyllysin und γ -Butyrobetain mittels HPLC-MS/MS _____	54
Tabelle 21: Kalibrationsbereiche zur Analyse der Konzentrationen an L-Carnitin, Acetyl- Carnitin, Trimethyllysin und γ -Butyrobetain mittels HPLC-MS/MS _____	54
Tabelle 22: Verwendete Geräte zur Genexpressionsanalyse _____	57
Tabelle 23: Zusammensetzung des Mastermix zur cDNA-Synthese _____	59
Tabelle 24: Zusammensetzung des Mastermixes für die q-PCR _____	60
Tabelle 25: Referenzgene, Primereigenschaften für q-PCR _____	61

Tabelle 26: Expressionsstabilitäten (M-Werte) der drei stabilsten Referenzgene in den verwendeten Geweben gemäß 'GeNorm' _____	62
Tabelle 27: Zielgene, Primereigenschaften für qPCR _____	62
Tabelle 28: Auswirkungen der Laktation auf die relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des UPS in der Muskulatur der nicht-laktierenden (Kontrolle) und laktierenden Gruppe zu beiden Biopsieentnahmezeitpunkten. _____	68
Tabelle 29: Auswirkungen der Laktation auf die relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR in der Leber der nicht-laktierenden (Kontrolle) und laktierenden Gruppe _____	69
Tabelle 30: Auswirkungen der Laktation auf die relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR in der Muskulatur nicht-laktierenden (Kontrolle) und laktierenden Gruppe zu beiden Biopsieentnahmezeitpunkten _____	70
Tabelle 31: Auswirkungen der Laktation auf die relative mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ausgewählter Zielgene in der Leber nicht-laktierenden (Kontrolle) und laktierenden Gruppe _____	72
Tabelle 32: Tägliche Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung und -verluste und Energiebilanz der Kontroll- und Behandlungsgruppen _____	73
Tabelle 33: Gewichtsentwicklung der Würfe der Kontroll- und Behandlungsgruppen ____	74
Tabelle 34: Überblick über die Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die Zusammensetzung der Milch der Sauen am 20. Tag post partum _____	76
Tabelle 35: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die Verteilung der Fettsäuren in Sauenmilch; angegeben in g/100g Gesamtfettsäuren _____	78
Tabelle 36: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die Konzentrationen freier Fettsäuren und Gesamtcarnitin, L-Carntin, Acetyl-Carnitin, γ -Butyrobetain und Trimethyllysin im Plasma laktierender Saunen ____	80
Tabelle 37: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Zielgenen in der Leber _____	82
Tabelle 38: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Zielgenen in der Muskulatur _	83
Tabelle 39: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Zielgenen im weißen Fettgewebe _____	84

Tabelle 40: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Genen der Carnitinaufnahme und -synthese in der Leber _____	85
Tabelle 41: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des NF- κ B in der Leber ____	86
Tabelle 42: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des NF- κ B in der Muskulatur	87
Tabelle 43: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des Nrf2 in der Leber _____	88
Tabelle 44: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des Nrf2 in der Muskulatur _	89
Tabelle 45: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR in der Leber__	90
Tabelle 46: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR in der Muskulatur _____	91
Tabelle 47: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und zugehöriger Zielgene in der Leber _____	92
Tabelle 48: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des UPS in der Muskulatur _____	93

1 Einleitung

Während der Laktation kommt es zu anpassungsbedingten Veränderungen im Metabolismus, um eine ausreichende Milchproduktion zu gewährleisten. Vor allem bei Ratte und Maus kommt es durch die Laktation zu einer Verminderung der Aktivität des Peroxisomenproliferator-aktivierten Rezeptor α (PPAR α), ein Transkriptionsfaktor, der tief greifend an der Regulation des Lipidmetabolismus beteiligt ist. Daraus resultiert ein energiesparender Effekt innerhalb des Organismus, der Energie zur Aufrechterhaltung der Milchproduktion zur Verfügung stellt. Des Weiteren konnte bei Ratten durch eine Aktivierung des PPAR α eine Störung dieses Regulationsmechanismus ausgelöst werden, was in einer geringeren Verfügbarkeit von Fettsäuren für die MilCHFettsynthese resultierte. Damit kam es durch einen geringeren MilCHFettgehalt zu einer Beeinträchtigung des Wachstums der Nachkommen.

Über die Bedeutung des PPAR α während der Laktation der Sau ist bisher nur wenig bekannt. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass bei laktierenden Sauen dieser Rezeptor in einzelnen Geweben gegenüber nicht-laktierenden Sauen vermehrt aktiviert ist. Jedoch wurden die Auswirkungen dieser Aktivierung auf die Milchproduktion und die Entwicklung der Nachkommen bisher nicht untersucht.

Des Weiteren wurde bei Rindern während der Laktation eine Entzündungsreaktion und Aktivierung der antioxidativen Abwehr in der Leber beobachtet. Hinweise auf eine ähnliche Reaktion konnte vor kurzem ebenfalls bei Sauen beobachtet werden. Weitere Erkenntnisse bezüglich der Veränderungen im Metabolismus bei Sauen sind jedoch nur in geringem Maße vorhanden.

Im Folgenden werden Hintergrundinformationen zum PPAR α , sowie die mit ihm in Verbindung stehenden Signal- und Stoffwechselwege erläutert.

2 Literaturübersicht

2.1 Laktation

2.1.1 Allgemeines zur Laktation und Fakten zur Laktation der Sau

Unter der Laktation versteht man das für Säugetiere einzigartige Stadium der Milchbildung zur Versorgung der Nachkommen im Anschluss an die Trächtigkeit. Über die Milch erhalten die Neugeborenen eine hochverdauliche Nahrung mit allen wertvollen Inhaltsstoffen, die sie zur Entwicklung in den ersten Tagen bis Wochen nach der Geburt benötigen (Ofstedal, 2012). Ebenfalls trägt die Milch über den hohen Gehalt an Immunglobulinen zur Ausprägung eines passiven Abwehrschutzes in den ersten Tagen *post natum* bei (Engelhardt und Ahrens, 2005) und hilft bei der Entwicklung der endokrinen Kompetenz (Capuco und Akers, 2009).

Die Milchezusammensetzung orientiert sich dabei an den unterschiedlichen Bedürfnissen der jeweiligen Tierart, kann aber auch innerhalb einer Art aufgrund von endogenen und exogenen Einflüssen variieren (Aurich und Engelhardt, 2010). Somit kann die Laktationsperiode, die Rasse, das Nahrungsangebot, das Klima, die Nachfrage durch den Nachwuchs, die Anzahl der Nachkommen, sowie deren Entwicklungsgeschwindigkeit die Zusammensetzung der Milch bei den unterschiedlichen Tierarten erheblich beeinflussen (Klobasa *et al.*, 1987; Wendt, 1994; Klopstein *et al.*, 1999; Capuco und Akers, 2009; Aurich und Engelhardt, 2010).

Eine ausreichend versorgte Zuchtsau kann je nach Rasse mehr als 2,3 Würfe pro Jahr mit durchschnittlich 10-12 Ferkeln produzieren (Kirchgeßner, 2008). Auch sind Würfe mit 14 Ferkeln pro Wurf und bis zu 30 Ferkel pro Sau und Jahr keine Seltenheit mehr (Knox, 2004). Die Milchleistung liegt dabei zwischen 8 und 10 kg pro Tag (King *et al.*, 1993; Kirchgeßner, 2008). Auld *et al.* (2000) beschrieben sogar eine tägliche Milchleistung von bis zu 13 kg. So produziert die Zuchtsau im Verhältnis zu ihrer Lebendmasse, unter Berücksichtigung des Protein- und Fettgehalts der Milch, etwa 30 bis 40 l Kuhmilch (Kirchgeßner, 2008). Hier ist die Milchezusammensetzung vor allem vom Alter, dem Laktationsstadium, der Jahreszeit, der Gemelkfraktion und von dem Drüsensegment abhängig (Ondersheka, 1969). Im Durchschnitt produzieren Sauen eine reife Milch mit einem Proteingehalt von 5,1 bis 5,6 g Protein/100g (Darragh und Moughan, 1998; Pluske *et al.*, 1998) und einem Energiegehalt von 4,7 bis 6,1 MJ/kg (Noblet und Etienne, 1986; Pluske und Dong, 1998; van den Brand *et al.*, 2000). Werte des Kolostrums liegen oberhalb dieser Grenzen. Je nach Entnahmezeitpunkt bewegt sich der Anteil des Fetts in einem Bereich von etwa 5 bis 8 % (Ondersheka, 1969; Pluske und Dong,

1998). Das Maximum ihres täglichen Produktionsvermögens erreicht die Sau etwa zwischen dem 20. und 21. Tag *post partum* (Gill und Thomson, 1956; Noblet und Etienne, 1986; Onderscheka, 1969). Einfluss auf die Menge der produzierten Milch nimmt neben der Wurfgröße und dem Geburtsgewicht, sowohl die Dauer zwischen den einzelnen Säugeperioden, als auch verschiedene Umweltbedingungen wie unterschiedliche Temperatur- und Lichtregime (Etienne *et al.*, 1998).

Der Zustand der Laktation bedeutet für das Muttertier eine große energetische Belastung, da der Körper von einem anabolen Trächtigkeitsmetabolismus in einen katabolen Stoffwechselzustand übergeht (Naismith, 1966; Shields und Mahan, 1983; Noblet *et al.*, 1990; Dewey, 1997; Westermeier *et al.*, 1998). Dies versucht der Körper durch eine gesteigerte Nahrungsaufnahme und durch einen erhöhten Abbau der Körperreserven zu decken (Shields und Mahan, 1983; Westermeier *et al.*, 1998). Meist reicht die Futteraufnahme jedoch nicht aus, um den Bedarf auszugleichen, was stark zu Lasten der Fett- und Proteindepots des Körpers geht (Clowes *et al.*, 2005; Rosenbaum *et al.*, 2012a).

2. 1. 2 Anpassungsmechanismen während der Laktation

Weitreichende Untersuchungen an Nagern konnten zeigen, dass ihr Organismus während der Laktation durch eine Hemmung des PPAR α eine Verminderung der Fettsäureoxidation und der Ketogenese in der Leber und Muskulatur verursacht, um vermehrt Fettsäuren zur Milchbildung bereitzustellen (Williamson, 1986; Whitelaw und Williamson, 1977; Gutgesell *et al.*, 2009). Ebenso wird über die Expression von Fettsäuretransportern und Enzymen des Fettsäuremetabolismus in der Milchdrüse die Menge an verfügbaren Rohstoffen für die Milchsynthese gesteigert (Gutgesell *et al.*, 2009). Es konnte ebenfalls dokumentiert werden, dass diese Spezies während der Laktation eine Verminderung der Thermogenese im braunen Fettgewebe aufwiesen (Trayhurn *et al.*, 1982; Trayhurn, 1983; Barbera *et al.*, 2000; Pedraza *et al.*, 2001) und eine erhöhte Glykolyse zusammen mit einer verminderten Aktivität der Enzyme des Citratzyklus in der Muskulatur auftrat (Xiao, 2004).

In den letzten Jahren gab es ebenso zahlreiche Aufzeichnungen, die sich mit diesem Thema am Beispiel der Kuh, als wichtigster Milchproduzent, auseinandersetzen (Loor *et al.*, 2005, 2006, 2007; Morris *et al.*, 2009; van Dorland *et al.*, 2009; McCarthy *et al.*, 2010; Rawson *et al.*, 2012; Schlegel *et al.*, 2012a, 2012b). Diese zeigten, dass die Kuh mit einer Erhöhung des Fettsäuremetabolismus in der Leber auf das Stadium der Laktation reagiert und sich auch mit einem entzündlichen Geschehen in der Leber auseinandersetzt. Somit wurde deutlich, dass

verschiedene Tierarten zu unterschiedlichen Reaktionen im Stande sind, mit denen sie solche Veränderungen im Stoffwechsel kompensieren können. Daher können keine speziesübergreifenden Aussagen getroffen werden.

Da die Zuchtsau ebenfalls eine enorme Leistung während der Sägezeit erbringt, ist auch hier eine Untersuchung der Anpassungsmechanismen in der Phase der Laktation interessant. Bisher existieren einzelne Studien zur Thematik der Regulationswege in der Milchdrüse (Theil *et al.*, 2005; Laspiur *et al.*, 2009). Clowes *et al.* (2005) konnten zeigen, dass Sauen während der Laktation stark auf das Proteinreservoir der Muskulatur zur Energieversorgung und Milchsynthese zurückgreifen. 2011 befassten sich Ringseis *et al.* (2011) mit dem Fettsäuremetabolismus im Bereich der quergestreiften Muskulatur und des Fettgewebes. Hier kam man zu dem Schluss, dass Sauen, im Gegensatz zu Ratten und Mäusen, nicht in der Lage sind, den Verbrauch von Fettsäuren in der Muskulatur zugunsten der Milchproduktion zu erniedrigen, sondern sogar mit einer Erhöhung des Verbrauchs der Fettsäuren reagieren.

Rosenbaum *et al.* (2012a) konnten bei Zuchtsauen darlegen, dass bei diesen, analog zur Kuh, das Entzündungsgeschehen in der Leber vermehrt aktiviert und damit bei Sauen gleichermaßen eine anpassungsbedingte Entzündungsreaktion mit einer entsprechenden Immunantwort während der Laktation vorhanden ist. In einer zweiten Studie bewies man die Hypothese, dass es außerdem zu einer Hochregulierung der cytoprotektiven und antioxidativen Abwehrmechanismen aufgrund vermehrt vorkommender reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) während der Laktation in der Leber kommt (Rosenbaum *et al.*, 2012b).

2.2 Der Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptor α (PPAR α)

2.2.1 Aufbau des PPAR α und der Ablauf seiner Signalkaskade

Der PPAR α , auch bekannt unter der Abkürzung NR1C1, gehört neben seinen Isoformen PPAR β/δ (NR1C2) und PPAR γ (NR1C3) der Familie der Transkriptionsfaktoren an, die durch spezifische Liganden aktiviert werden können. Diese Liganden können entweder endogener oder synthetischer Natur sein (Willson und Wahli, 1997). Hierzu zählen zum einen freie Fettsäuren, besonders mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Eicosanoide und Prostaglandine, zum anderen synthetische Agonisten der Fibrat-Familie (Clofibrat, Bezafibrat, Fenofibrat) und Fibratderivate (Forman *et al.*, 1997; Escher und Wahli, 2000; Berger und Moller, 2002; Ferré, 2004; Mandard *et al.*, 2004). Ebenso ist bekannt, dass der Rezeptor durch Energierestriktion (Kersten *et al.*, 1999) und durch die externe Aufnahme mehrfach ungesättigter Fettsäuren der

Rezeptor aktiviert werden kann (Lin *et al.*, 1999; Mandard *et al.*, 2004), was über die Anflutung freier Fettsäuren über die Blutbahn zustande kommt. Hierbei wirken Linol-, α -Linolen-, Arachidon-, Eicosapentaen- und Docosahexaensäure als stärkste Aktivatoren, wohingegen langkettige gesättigte oder kurzkettige Fettsäuren eine erheblich schwächere oder keine Wirkung haben (Forman *et al.*, 1997; Krey, 1997).

Hohe Expressionsraten dieses Rezeptors finden sich in Leber, Niere, Herz und Skelettmuskel (Isseman und Green, 1990; Auboeuf *et al.*, 1997; Nishimura *et al.*, 2004). Im Magen-Darm-Trakt konnte eine Expression in geringerem Ausmaß festgestellt werden (Braissant, 1996; Auboeuf *et al.*, 1997). Isseman *et al.* (1990) konnten den PPAR α in Gehirn und Hoden, Braissant (1996) im Pankreas und den Ovarialfollikeln in sehr geringer Ausprägung nachweisen. Bei Schweinen liegt dieser Rezeptor auch im Bereich des weißen Fettgewebes in hohem Maße vor (Ding *et al.*, 2000). Gewebe mit hohem Vorkommen des Rezeptors sind Orte mit hoher mitochondrialer und peroxisomaler β -Oxidation. Dies zeigte somit, dass der PPAR α zum katabolen Fettsäuremetabolismus beiträgt (Braissant, 1996). Darüber hinaus hat er einen weitreichenden Einfluss auf die Glukoneogenese und Ketogenese (Kersten *et al.*, 1999; Mandard *et al.*, 2004), den Aminosäurestoffwechsel, den Gallensäuremetabolismus sowie auf das Entzündungsgeschehen des Organismus (Mandard *et al.*, 2004).

Im Aufbau des Rezeptors bestehen Ähnlichkeiten zu den Kernrezeptoren der Schilddrüsenhormone, Retinsäure und Vitamin D3 (Desvergne, 1999; Kersten *et al.*, 1999; Escher und Wahli, 2000), weshalb sie zusammen auch unter der Bezeichnung der nukleären Hormonrezeptoren bekannt sind (Lin *et al.*, 1999). Wird ein Ligand in der für Kernrezeptoren typischen *Ligand Binding Domain* (LBD) gebunden, kann der Rezeptor mit der charakteristischen *DNA-Binding Domain* (DBD), die aus zwei Zinkfingern besteht, an ein *PPAR-Response Element* (PPRE) in der Promotorregion der Zielgene binden und die Expression veranlassen. Hierzu muss der PPAR α ein Heterodimer mit dem *Retinoid-X-Rezeptor* (RXR) formen (Abb.1), um an dem PPRE binden zu können (Fruchart *et al.*, 1999; Berger und Moller, 2002). Der RXR kommt in den verschiedenen Formen RXR α , RXR β und RXR γ vor und muss ebenfalls durch Liganden, wie all-trans-, 9-cis-Retinsäure, Docosahexaen- oder Arachidonsäure aktiviert werden (Heyman *et al.*, 1992; Lengqvist, 2004). Das PPRE setzt sich aus der sich einmal wiederholende Sequenz "AGGTCA" zusammen, wobei die beiden Wiederholungen durch eine beliebige Base getrennt werden (Kliwer *et al.*, 1992; Ferré, 2004; Monsalve *et al.*, 2013). Nach erfolgreicher Bindung des Komplexes kann eine Expression der PPAR α -abhängigen Gene erfolgen.

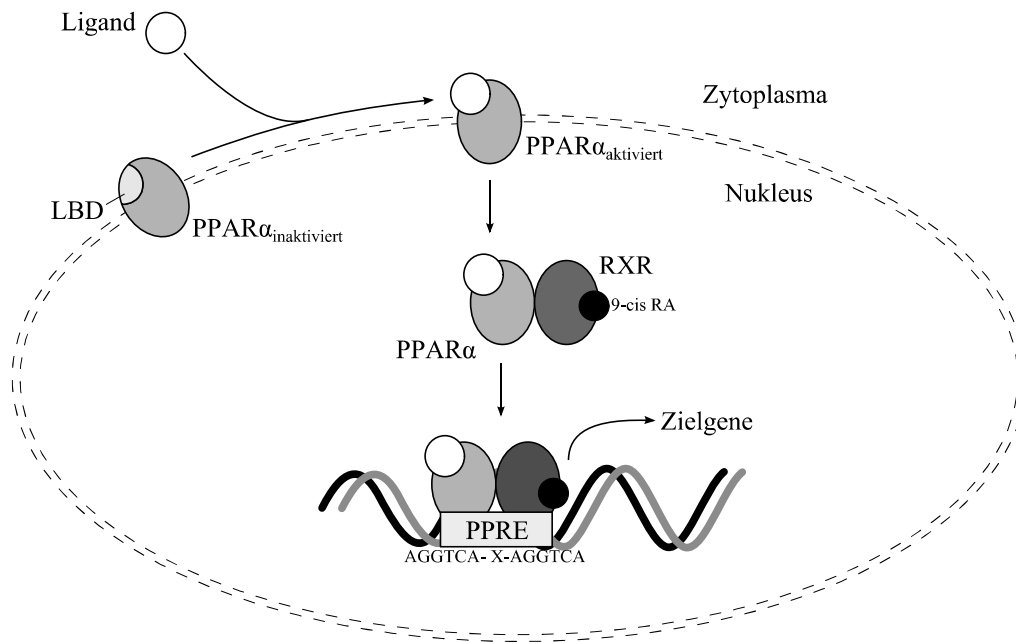


Abbildung 1: Prinzip der Genexpression durch PPARα. Bindet ein spezifischer Ligand an der LBD des PPARα, wird dieser aktiviert und bildet mit RXR ein Heterodimer. RXR ist durch die 9-cis-Retinsäure ebenfalls aktiviert worden. Das Dimer stellt einen aktiven Transkriptionsfaktor dar, der an das PPRE bindet und die Zielgene mit einem PPRE in ihrer Promotorregion aktiviert. 9-cis RA 9-cis-Retinolsäure; LBD Ligand Binding Domäne; PPARα Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α; RXR Retinoid-X-Rezeptor; PPRE PPAR Response Element. Schema in Anlehnung an Fruchart *et al.* (1999).

Bisher ist bekannt, dass die Auswirkungen einer Aktivierung des PPARα bei unterschiedlichen Spezies nicht immer gleich verlaufen. Nager reagierten nach einer Aktivierung des Rezeptors mit einer starken Proliferation der Peroxisomen und der Induktion peroxisomaler Enzyme in der Leber, was über eine Hepatomegalie bis hin zur Entstehung eines Leberkarzinoms führen kann (Richert *et al.*, 1996; Perrone *et al.*, 1998; Holden und Tugwood, 1999; Cheon *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Beobachtung erhielt nicht nur der Rezeptor seinen Namen, sondern Ratten und Mäuse wurden unter der Bezeichnung der "proliferierende Spezies" zusammengefasst. Weitere Tierarten, wie Primaten, Schweine oder Meerschweinchen oder auch der Mensch, reagieren jedoch auf andere Art und Weise. Im Gegensatz zu den Nagern zeigten diese in der Leber eine schwächere Expression des PPARα und keine bzw. nur moderate Proliferation der Peroxisomen (Holden und Tugwood, 1999). Bei Schweinen konnten mRNA-Konzentrationen in der Leber gemessen werden, die nur ein Zehntel der bei Ratten und Mäusen gemessenen Werte betrugen (Luci *et al.*, 2007a). Aufgrund dieser Eigenschaft werden diese Tierarten zu der Gruppe der "nicht-proliferierenden Spezies" zusammengefasst (Luci *et al.*, 2007b; Ringseis *et al.*, 2009; Eder und Ringseis, 2010).

2. 2. 2 Die Bedeutung des PPAR α für die Laktation

Es ist mehrfach bewiesen worden, dass während des Fastens eine Aktivierung des PPAR α als Adaptationsmechanismus stattfindet (Kersten *et al.*, 1999; Escher und Wahli, 2000; Cheon *et al.*, 2005). Hierbei wirken die aus dem Fettgewebe freigesetzten Fettsäuren als Liganden des Rezeptors und bewirken in der Leber eine Transkription der entsprechenden Zielgene, die für die peroxisomale und mitochondriale β -Oxidation, Ketogenese und Glukoneogenese notwendig sind (Mandard *et al.*, 2004). Da die Laktation einen stark katabolen Stoffwechselzustand, vergleichbar dem des Fastens darstellt, wurde auch hier eine Aktivierung des PPAR α untersucht und beobachtet (Ringseis *et al.*, 2011). Um den erheblichen Energiegehalt der Milch und die enorme Milchproduktion zur Versorgung des Nachwuchses (Kirchgeßner, 2008) aufrechtzuerhalten, fluten Fettsäuren durch die stark negative Energiebilanz über die Blutbahn an den Zielgeweben an und bewirken ebenfalls eine Aktivierung des PPAR α (Ringseis *et al.*, 2011).

Anhand der Beobachtung, dass ein Anstieg einzelner Wege des Fettsäuremetabolismus in der Leber wie Fettsäureaktivierung, β -Oxidation und des Carnitin-Systems vorliegt, konnte auf eine generelle Steigerung dieses Stoffwechselweges bei laktierenden Sauen durch eine PPAR α -Aktivierung geschlossen werden (Rosenbaum *et al.*, 2012a, 2012b). Rosenbaum *et al.* (2012a) konnten zusätzlich weitere Stoffwechselwege aufzeigen, die durch Aktivierung des Rezeptors beeinflusst wurden. Eine erhöhte Expressionsrate erfuhren solche Gene, die für Enzyme des Aminosäurestoffwechsels kodierten, die glukogene Aminosäuren synthetisieren und somit zur Glukoneogenese beitrugen. Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression von Enzymen des Citratzyklus erfasst.

2. 3 Laktationsbedingte Veränderungen im Immunsystem

Die Laktation wird nicht nur von einer Umstellung vom anabolen zum katabolen Stoffwechsel begleitet, sondern es finden sich auch Veränderungen im Abwehrsystem (Loor *et al.*, 2005; Loor *et al.*, 2007; Trevisi *et al.*, 2012; Geßner *et al.*, 2013).

Den Reaktionen des Immunsystems liegt ein zentraler Rezeptor zugrunde, der *Nuclear Factor-kappa B* (NF- κ B). Er stellt den zentralen Knotenpunkt des Entzündungsgeschehens dar (Siebenlist *et al.*, 1994; Pahl, 1999). Ebenfalls wurden Veränderungen bezüglich des Signalweges des *Nuclear Factor-erythroid 2-related Factor-2*, kurz Nrf-2, aufgezeigt (Rosenbaum *et al.*, 2012b; Geßner *et al.*, 2013), der innerhalb der antioxidativen und

cytoprotektiven Abwehr eine große Rolle spielt (Chen, 2006; Kaspar *et al.*, 2009; Baird und Dinkova-Kostova, 2011).

2. 3. 1 Aufbau des NF- κ B und Ablauf seiner Signalkaskade

Der NF- κ B wurde erstmals im Jahre 1986 in murinen B-Lymphozyten entdeckt (Sen und Baltimore, 1986), konnte aber mittlerweile in vielen verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden und gilt als ubiquitär verbreitet (Baeuerle, 1994; Epstein *et al.*, 1997; Zingarelli, 2005). Innerhalb der Klasse der Säugetiere wurden bisher sechs unterschiedliche NF- κ B-Proteine beschrieben, die alle der *Relish*- (Rel-) Familie angehören (Zingarelli, 2005). Zu ihnen zählen p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2), Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB und v-Rel, wobei p105 und p100 die jeweiligen Vorstufen der entsprechenden Proteine darstellen (Siebenlist *et al.*, 1994; Epstein *et al.*, 1997; Barnes, 1997; Pahl, 1999; Ghosh und Karin, 2002). Sie agieren als Homo- oder Heterodimer, wobei das häufigste und potenteste Heterodimer aus RelA (p65) und p50 gebildet wird (Epstein *et al.*, 1997; Pahl, 1999), im Folgenden nur als NF- κ B beschrieben. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten unterscheiden sich im Spektrum ihrer Zielgene und ihrer Aktivierungsstärke (Siebenlist *et al.*, 1994; Barnes, 1997).

Allen NF- κ B-Proteinen gemein ist die *Rel Homologous Domain* (RHD), die für die Dimerisation, die DNA-Bindung, die Wanderung in den Kern und den Kontakt mit ihren Inhibitorproteinen, den I κ Bs, verantwortlich ist (Pahl, 1999; Ghosh und Karin, 2002). Von diesen Inhibitorproteinen sind sieben verschiedene Varianten bekannt, I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, sowie die Vorstufen p100 und p105 (Ghosh *et al.*, 1998). Sie besitzen in ihrer Struktur wiederholende Ankyrin-Motive, welche für die Bindung am RHD zuständig sind (Jacobs und Harrison, 1998). Am RHD verbergen sie die *Nuclear Localisation Sequence* (NLS), ohne die eine Translokation in den Kern nicht möglich ist (Siebenlist *et al.*, 1994; Jacobs und Harrison, 1998; Ghosh *et al.*, 1998). Im unstimulierten Zustand bilden die NF- κ B-Dimere mit den I κ Bs einen inaktiven zytosolischen Komplex (Epstein *et al.*, 1997; Siebenlist *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 1998). Die Hauptvertreter der I κ Bs sind I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ , da sie die einzigen Vertreter sind, die eine Regulationseinheit für den stimulus-induzierten Abbau aufweisen (Karin und Ben-Neriah, 2000).

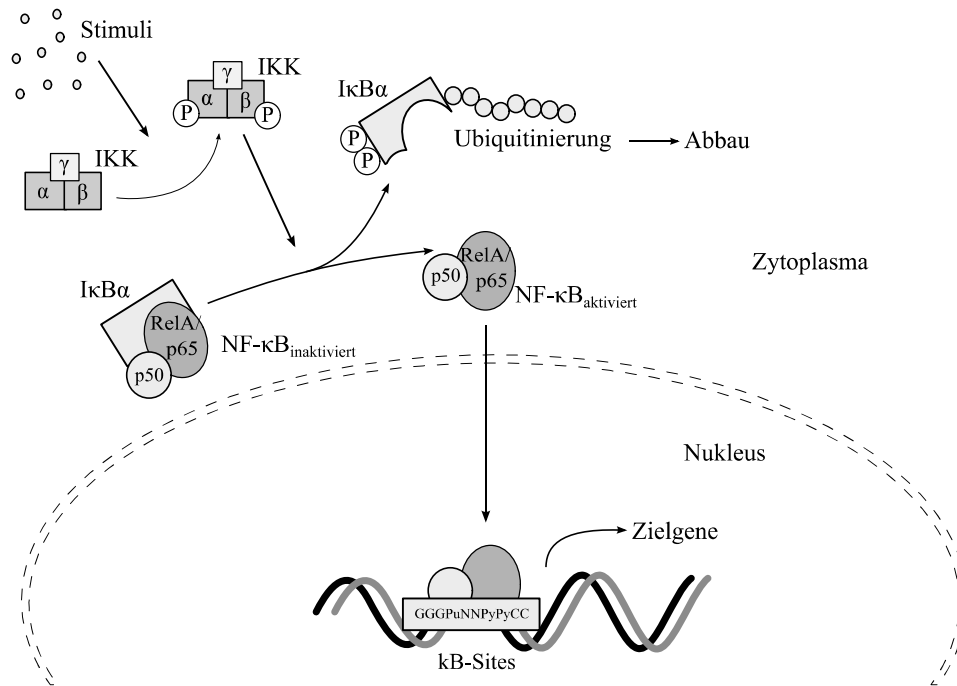


Abbildung 2: Prinzip der Genexpression durch NF-κB. Im unstimulierten Zustand liegt der NF-κB gebunden an sein Inhibitorprotein IκBα inaktiv im Zytoplasma vor. Im stimulierten Zustand wird die IKK aktiviert und phosphoryliert IκB. Phosphoryliertes IκB löst sich von dem NF-κB-Dimer und wird nach Ubiquitinierung im Ubiquitin-Proteasomen-System abgebaut. Das freie NF-κB kann anschließend in den Kern wandern und dort an seinen κB-Sites binden. Es folgt die Transkription der Zielgene. *IκBα* Inhibitor α of κB; *IKK* IκB-Kinase; NF-κB Nuclear Factor κB. Schema in Anlehnung an Ghosh und Karin (2002).

Erfolgt nun eine Stimulation der Zelle, kommt es zu einer Aktivierung der IκB-Kinase (IKK) (Israel, 2010). Diese besteht aus drei Anteilen, der IKKα, IKKβ und IKKγ (NEMO), wobei IKKα und IKKβ die katalytische und IKKγ die regulatorische Funktion übernimmt (Ghosh und Karin, 2002; Israel, 2010). Die IKK veranlasst eine Phosphorylierung von IκBα, welches umgehend ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom abgebaut wird (Karin und Ben-Neriah, 2000), was in Abbildung 2 dargestellt ist. Weitere Wege zum Abbau von IκBs sind noch nicht hinreichend erforscht und bedürfen weiterer Untersuchungen. Auch die Umwandlung der Vorstufeninhibitoren p100 und p105 scheint auf dem Ubiquitin-Proteasomen-System zu basieren, ist aber ebenso noch nicht gänzlich geklärt (Karin und Ben-Neriah, 2000).

Da somit der inaktivierende Teil entfernt wurde und die NLS freiliegt, kann das NF-κB-Dimer folglich in den Kern wandern und an so genannte *κB-Sites* binden (Abb. 2). Diese *κB-Site* beschreibt eine Sequenz mit der Basenabfolge 5'-GGGPPuNNPyPyCC-3' (Baeuerle, 1994; Barnes, 1997; Karin und Ben-Neriah, 2000), wobei "Pu" eine Purinbase, "Py" eine Pyrimidinbase und "N" eine willkürliche Base beschreibt. Durch die Bindung an diese

Sequenz, die sich in der Promotorregion der Zielgene befindet, wird die Transkription dieser eingeleitet.

Als Auslöser einer Signalantwort kommt bei NF- κ B eine Vielzahl an Stimuli in Frage. Hierzu gehören unter anderem bakterielle, virale oder parasitäre Oberflächenproteine, proinflammatorische Cytokine, Proteinkinase C-Aktivatoren, ultraviolette oder radioaktive Strahlung, sowie oxidativer Stress als auch Stress im endoplasmatischen Retikulum (Barnes, 1997; Pahl, 1999). Neben Adhäsionsmolekülen, Akute-Phase-Proteinen, Chemokinen, Cytokinen, Rezeptoren und Wachstumsfaktoren gehören mehr als 150 Zielgene dem NF- κ B an, die alle weitreichend am Entzündungsgeschehen des Körpers beteiligt sind (Pahl, 1999). Da exprimierte Cytokine, wie TNF α oder IL-1, gleichzeitig zu den Aktivatoren als auch zu den aktivierten Genen zählen, wird die Entzündungsantwort in einem positiven Regelkreis aufrechterhalten (Siebenlist *et al.*, 1994; Barnes, 1997). Allerdings ist NF- κ B auch in der Lage durch das Vorhandensein dreier κ B-Sites in der Promotorregion von I κ B α (Ito *et al.*, 1994) die Expression des eigenen Inhibitors einzuleiten (Barnes, 1997; Ghosh *et al.*, 1998). In Form eines negativen Regelkreises unterbricht NF- κ B infolgedessen seine eigene Aktivität. I κ B α ist dabei in der Lage, neben der Bildung des hemmenden Komplexes, auch direkt am aktiven NF- κ B an der DNA anzusetzen und diesen ins Zytosol zurückzuführen (Zabel und Baeuerle, 1990; Ghosh *et al.*, 1998; Fernandez-Alvarez *et al.*, 2011).

2. 3. 2 Aufbau und Ablauf der Signalkaskade des Nrf2

Der Nrf2 gilt als der wichtigste Transkriptionsfaktor im antioxidativen Abwehrgeschehen (Kaspar *et al.*, 2009). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), reaktive Stickstoffspezies (RNS) und Elektrophile werden im Körper als Nebenprodukte während einer Vielzahl von physiologischen, aber auch pathologischen Reaktionen gebildet. Im Falle eines Ungleichgewichts mit zu hohem Vorkommen dieser Substanzen, kann es aufgrund ihrer hohen Reaktivität zu starken Schäden an Zellen und Geweben kommen. Sie müssen somit aus dem Organismus eliminiert und ein Gleichgewicht wiederhergestellt werden (Kaspar *et al.*, 2009; Jung und Kwak, 2010; Kim *et al.*, 2010; Ma, 2013). Hierbei agiert der Nrf2 als zentraler Transkriptionsfaktor detoxifizierender, zytoprotektiver und antioxidativer Gene (Baird und Dinkova-Kostova, 2011).

Dieser *basic leucine zipper*-Transkriptionsfaktor gehört, neben NF-E2, Nrf1, Nrf3, Bach1 und Bach2, zu der *Cap'n'Collar*- (CNC-) Familie. Sie alle binden an eine ihnen spezifische Sequenz, welche als ARE (*Antioxidant Response Element*) bezeichnet wird und die

Basenabfolge 5'-TGACNNNGC-3' (N - willkürliche Base) aufweist (Lee und Johnson, 2004; Baird und Dinkova-Kostova, 2011; Tkachev *et al.*, 2011; Ma, 2013). Diese Promotorregion ist auch unter dem Namen *Electrophile Response Element* (EpRE) bekannt (Baird und Dinkova-Kostova, 2011).

Um an das ARE binden zu können, muss Nrf2 ein Heterodimer mit kleinen Maf-Proteinen (MafF, G, T) bilden (Li *et al.*, 2008; Ma, 2013). Ebenso kommt auch das *jun proto-oncogene* (c-Jun) (Venugopal und Jaiswal, 1998) und der *Activating Transcription Factor 4* (ATF4) (He, 2001) als Dimerisierungspartner in Frage. Jedoch zeigt das kleine Maf-Protein MafK eine hemmende Wirkung (Nguyen, 2000).

Das Grundgerüst des Nrf2 besteht aus sechs Untereinheiten, den so genannten *Nrf2-ECH-Homology* (Neh) -Domänen (Neh 1-6), welche unterschiedliche Funktionen besitzen. Neh1 besteht aus der typischen *basic leucine Zipper*-Domäne und dient der Dimerisation und Bindung mit dem ARE. Neh 3, 4 und 5 binden unterschiedliche Koaktivatoren. Neh 2 und 6 fungieren als Regulationseinheiten der Proteinstabilität. Des Weiteren dient Neh2 der Bindung des Inhibitorproteins Keap1 (Tkachev *et al.*, 2011).

Das Inhibitorprotein Keap1 (*Kelch-like ECH-Associating Protein 1*) ist ebenso aus mehreren Untereinheiten aufgebaut; die BTB-Domäne (*bric-à-brac, tramtrack, broad complex*), welche zur Dimerisation und Proteininteraktion dient, die IVR-Domäne (*Intervening Region*) mit reaktiven Cysteinresten und die DGR-Domäne (*Double Glycine Repeats - Kelch repeats*), über die das Keap1 mit der Neh2 des Nrf2, als auch mit dem Aktin im Zytoskelett der Zelle in Verbindung steht (Kaspar *et al.*, 2009; Baird und Dinkova-Kostova, 2011; Ma, 2013). Über die BTB bindet Keap1 ferner Cullin 3/*Ringbox protein 1* (Cul3/Rbx1), wodurch es einen Kontakt zum E3-Ubiquitinligase-Komplex aufbauen kann (Cullinan *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004).

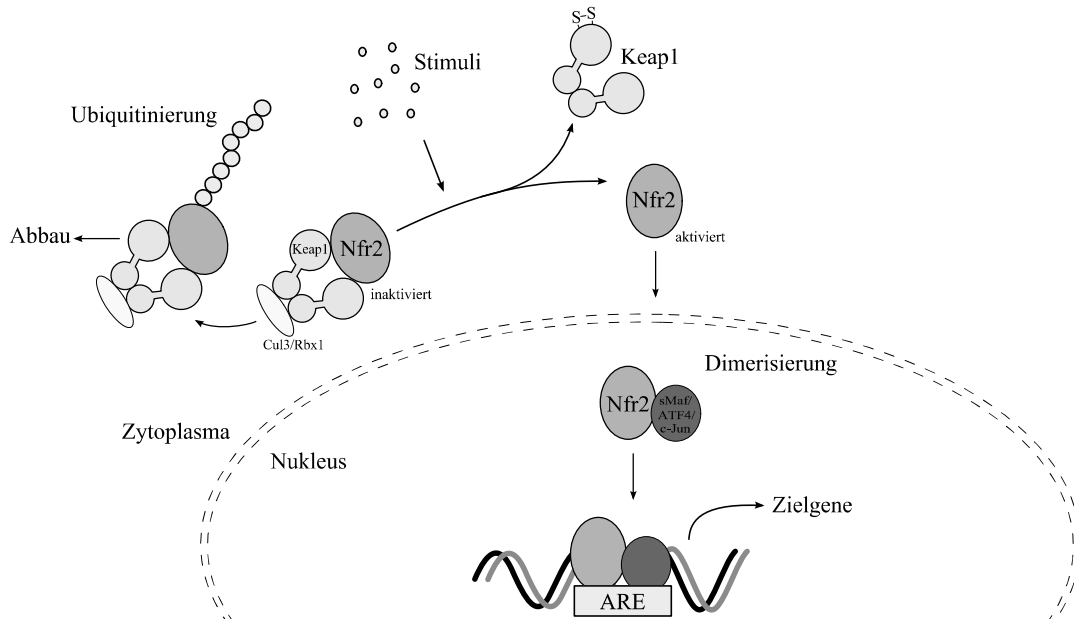


Abbildung 3: Prinzip der Genexpression durch Nrf2. Nrf2 wird unter basalen Bedingungen durch die Bindung von Keap1 und den daran anschließenden Cul3/Rbx1-E3-Ubiquitinligase-Komplex abgebaut. Durch Stimulatoren (ROS, Elektrophile) wird Keap1 in seinen Cystinresten verändert und gibt den zuvor gebundenen Nrf2 frei. Dieser wandert in den Kern, bildet ein Heterodimer mit sMaf, ATF4 oder c-Jun und induziert die Transkription der Zielgene mit einem ARE in ihrer Promotorregion. *ARE* antioxidant response element; *ATF4* Activating Transcription Factor 4; *c-Jun* Jun Proto-Oncogene; *Cul3* Cullin 3; *Keap1* Kelch-like ECH-associating Protein 1; *Nrf2* Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor-2; *Rbx1* RING Box Protein 1; *ROS* Reaktive Sauerstoffspezies; *sMaf* Small Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Proteins. Schema in Anlehnung an Tkachev *et al.* (2011).

Im unstimulierten Zustand ist der Nrf2 stets durch das Homodimer seines Inhibitorproteins am Aktin des Zytoskeletts der Zelle gebunden und wird nach Ubiquitinierung kontinuierlich durch das 26S-Ribosom abgebaut (Abb. 3) (Kaspar *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Tkachev *et al.*, 2011). Besteht nun ein Überschuss an ROS oder Elektrophilen, werden durch Reaktion dieser mit den Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste Disulfidbrücken in der IVR des Keap1 gebildet. Durch die Änderung der dreidimensionalen Struktur des Inhibitorproteins wird der Nrf2 gelöst und kann in den Kern wandern. Nach Bildung des Heterodimers kann er dort die Transkription der Zielgene mit einem ARE in der Promotorregion veranlassen (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2010), was in Abbildung 3 dargestellt ist. Zu diesen zählen unter anderem Enzyme der Phase-II-Reaktion des Fremdstoffmetabolismus, zelluläre Signalproteine und antioxidative Enzyme (Itoh *et al.*, 1997; Kaspar *et al.*, 2009; Ma, 2013).

Zur Aktivierung des Nrf2 existieren jedoch noch diverse andere Modelle, die nicht bis ins Detail bewiesen sind. Sie zeigen aber, dass unterschiedliche Wege für Induktoren existieren und nicht alle auf eine einheitliche Art und Weise agieren. Für weitere Erkenntnisse bedarf es einer intensiveren Forschung.

2. 3. 3 Interaktion zwischen NF- κ B und Nrf2

ROS kommen als auslösende Substanzen sowohl im Signalweg des NF- κ B, als auch in dem des Nrf2 vor. Über die Aktivierung des NF- κ B führen sie zur Induktion einer Entzündungsantwort, durch welche weitere ROS gebildet werden (Hakim, 1993). Im Bereich des Nrf2 induzieren sie die antioxidative Abwehr (siehe 1.3.2).

In Studien konnte dargelegt werden, dass der Nrf2 zusätzlich auch an der Bekämpfung des Entzündungsgeschehens beteiligt ist, sowie eine schützende Wirkung auf Gewebe und Zellen besitzt (Braun *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2002; Cho, 2004; Chen, 2006). Untersuchungen an Nrf2-Knockout-Mäusen zeigten übersteigerte Entzündungs- und Autoimmunreaktionen in verschiedenen Organen (Ma *et al.*, 2006), wie auch eine erhöhte Empfänglichkeit für experimentell induzierte Erkrankungen (Rangasamy *et al.*, 2004; Rangasamy, 2005; Khor *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2010). Die Wildtypen dagegen wiesen erhöhte Expressionsraten der antioxidativen Enzyme und verminderte Raten an proinflammatorischen Substanzen auf. Nrf2-Knockout-Mäuse, die eine Nrf2-Aktivierung erfuhren und bei denen zusätzlich mittels Lipopolysaccharid die Induktion einer Entzündungsreaktion hervorgerufen wurde, reagierten mit einer Verminderung der proinflammatorischen Substanzen (Innamorato *et al.*, 2008; Koh *et al.*, 2011).

Die Verminderung der inflammatorischen Reaktion beruht auf einer Interaktion der Signalwege von Nrf2 und NF- κ B. Es konnte bewiesen werden, dass Nrf2-Aktivatoren fähig sind, hemmend in den Signalweg des NF- κ B einzugreifen. Über die Veränderung der Cystinreste des Keap-1, wird die Aktivität des Nrf2 gesteigert (siehe 1.3.2). Solche Cystinreste konnten bei der p50- und p65-Untereinheit des NF- κ B und bei der IKK β durch den Nrf2-Aktivator 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin-J₂ (15d-PGJ₂) verändert werden, was zu einer Inhibierung des NF- κ B führte (Straus *et al.*, 2000; Cernuda-Morollon, 2001).

Des Weiteren konnten Xu *et al.* (2005b) beweisen, dass die Nrf2-Aktivatoren Phenylethylisothiocyanat (PEITC - Xu, 2006) und Sulforaphan (Shinkai *et al.*, 2006), über die Hemmung der Phosphorylierung von IKK und I κ B und über die Inhibierung der Wanderung von p65 in den Kern, die Wirkung des NF- κ B blockieren konnten (Xu *et al.*, 2005b). Lee *et al.* (2009) zeigten, dass Keap1 nicht nur als Inhibitor des Nrf2 agiert, sondern auch IKK β bindet, diese dem E3-Ubiquitinligase-Komplex zuführt und somit die Freisetzung des NF- κ B behindert.

Ob jedoch auch eine direkte Interaktion zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren existiert, bleibt noch zu überprüfen.

2. 3. 4 Wirkung des PPAR α im Entzündungsgeschehen

Durch den Nachweis einer verlängerten Entzündungsreaktion bei PPAR α -Knockout-Mäusen konnten Devchand *et al.* (1996) erstmals einen Beweis für die Beteiligung des PPAR α am Entzündungsgeschehen erbringen. Der natürliche PPAR α -Agonist Leukotrien B4 (LTB4) konnte diesen Signalweg aktivieren und die Bildung von Enzymen veranlassen, die zum Erliegen des Entzündungsprozesses durch den Abbau solcher proinflammatorischer Zytokine führten. Somit induziert LTB4 seinen eigenen Katabolismus. Durch den Wegfall der PPAR α -bedingten Wirkung zeigte sich bei PPAR α -Knockout-Mäusen eine verlängerte Immunantwort als Reaktion auf LTB4 (Devchand *et al.*, 1996). Diese Wirkung konnte durch weitere Studien bestätigt werden, in denen anhand von Versuchen *in vitro* und *in vivo* ebenfalls eine inhibitorische Wirkung des PPAR α auf die Expressionsrate zytokininduzierter Gene aufgezeigt werden konnte (Staels *et al.*, 1998b; Poynter, 1998; Delerive, 1999; Kockx *et al.*, 1999; Marx *et al.*, 1999).

Dieser Effekt kommt aufgrund einer Interaktion mit dem Signalweg des NF- κ B zustande. Delerive *et al.* (1999, 2002) konnten einen direkten Kontakt der LBD des PPAR α zur RHD der p65-Untereinheit des NF- κ B nachweisen, woraus eine verminderte Expression der NF- κ B-Zielgene resultierte. In einer weiteren Studie fand man heraus, dass dies auf der Expression des Inhibitorproteins I κ B α basiert (Delerive, 2000). Delerive *et al.* (2000) konnten zeigen, dass jedoch nicht die Translokation in den Kern behindert, sondern die DNA-Bindungsaktivität des Komplexes über eine Ansammlung neusynthetisierter I κ B Proteine im Kern herabgesetzt wird. Jedoch wurde herausgefunden, dass diese Tatsache nicht darauf beruht, dass I κ B ein direktes Zielgen des PPAR α darstellt, sondern dass PPAR α über Stimulation der p65-Untereinheit die negative Rückkopplung des NF- κ B aktiviert (Delerive, 2002). Die im Promotor des I κ B befindliche *κ B-side* wird durch PPAR α verstärkt aktiviert und führt zur Unterdrückung der NF- κ B-Bindungsaktivität (Delerive, 2002).

In einer Studie von Poynter *et al.* (1998) konnte dargelegt werden, dass über den Signalweg des PPAR α , angesichts verminderter Mengen an ROS und H₂O₂, der oxidative zelluläre Stress verringert werden konnte. Sie beschrieben die Theorie, dass durch das verminderte Vorkommen der auslösenden Substanzen des NF- κ B-Signalwegs, dessen Aktivität ebenfalls gesenkt und die Produktion proinflammatorischer Substanzen reduziert wird.

2.4 Sterol Regulatory Element Binding Proteins

Im Hinblick auf die Auswirkung einer PPAR α -Aktivierung auf den Lipidmetabolismus, haben sich in den letzten Jahren einige Studien mit der Hypothese beschäftigt, dass auch der Signalweg der *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*, kurz SREBPs, die ebenfalls am Lipidstoffwechsel beteiligt sind, durch diese Aktivierung beeinflusst wird (Roglans *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2001; Shiota *et al.*, 2003; Le Jossic-Corcos *et al.*, 2004; Knight *et al.*, 2005; König *et al.*, 2007; Luci *et al.*, 2007a; Fernandez-Alvarez *et al.*, 2011).

Die SREBPs sind Transkriptionsfaktoren, die in inaktivierter Form an der Membran des endoplasmatischen Retikulum (ER) gebunden vorliegen. Sie gehören zu der Familie der *basic helix-loop-helix-leucin zipper* Transkriptionsfaktoren (Brown und Goldstein, 1997). Sie bestehen aus einer DNA-bindenden Region, zwei transmembranen Segmenten mit einer innerhalb des ER liegenden schlaufenförmigen Sequenz und einer zur Regulation fähigen Region am Carboxy-Terminus (Eberlé *et al.*, 2004).

SREBPs bilden zusammen mit dem Begleitprotein SCAP (*SREBP Cleavage-Activating Protein*) ein Dimer, das sie nach einem Stimulus vom ER zum Golgi-Apparat befördert, wo die SREBPs weiteren Modifikation unterzogen werden (Abb. 4). Dort spaltet die *Site-1*- und *Site-2*-Protease die SREBPs, bis nur noch der N-Terminus als aktiver Teil bestehen bleibt (*nuclear SREBP* - nSREBP) und in den Kern wandert. Dort bindet es an die *Sterol Response Elements* (SRE) und kann die Transkription der Zielgene veranlassen (Brown und Goldstein, 1997; Horton und Shimomura, 1999; Shimano, 2001; Horton *et al.*, 2002).

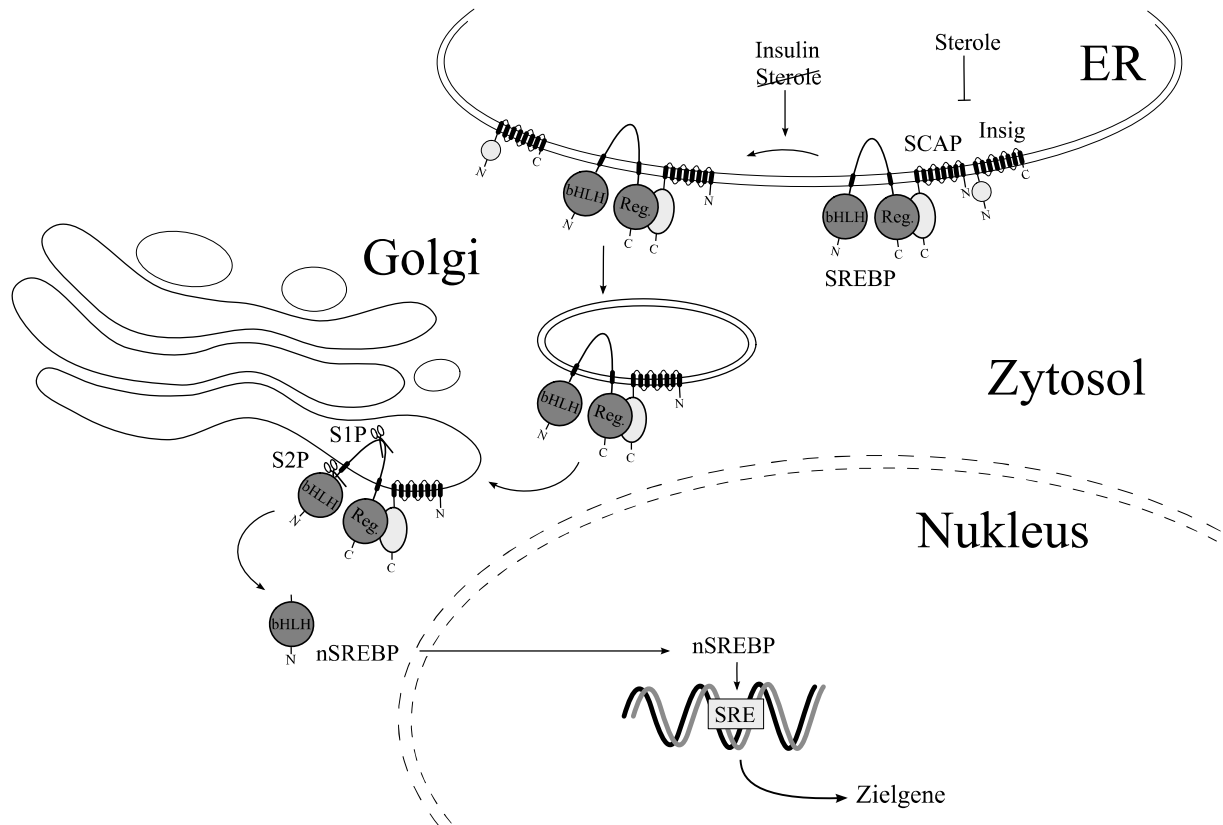


Abbildung 4: Prinzip der Genexpression durch SREBPs. Das SREBP (hier allgemein für SREBP-1c und -2 beschrieben) liegt im unstimulierten Zustand zusammen mit dem Begleitprotein SCAP an die Inhibitorproteinen Insig 1 und 2 in der Membran des Endoplasmatischen Retikums gebunden vor. Durch einen Mangel an Sterolen oder über einen Anstieg des Insulinspiegels, löst sich SCAP von Insig und eskortiert das bislang noch unaktivierte SREBP zum Golgi-Apparat. Dort durchtrennt das S1P die innere Schlaufe des SREBP, die außen liegende bHLH-Domäne wird durch das S2P abgespalten. Das isolierte nSREBP wandert in den Kern und bewirkt die Expression seiner Zielgene.

Abkürzungen: *bHLH* Basic Helix-Loop-Helix-Leucin Zipper; *ER* Endoplasmatisches Retikulum; *Insig* Insulin-Induced Gene; *nSREBP* Nuclear SREBP; *Reg* Regulatorische Domäne; *S1P* Site-1-Protease; *S2P* Site-2-Protease; *SCAP* SREBP Cleavage-Activating Protein; *SREBP* Sterol Regulatory Element Binding Protein; *SRE* Sterol Response Element. Schema in Anlehnung an Espenshade (2006).

Innerhalb der Gruppe der SREBPs existieren drei Isoformen, SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2. In der Leber kommen überwiegend die Formen SREBP-1c und SREBP-2 vor, wobei SREBP-1c maßgeblich für die Triglycerid- und SREBP-2 für die Cholesterinsynthese verantwortlich ist (Shimano, 2001; Horton *et al.*, 2002). SREBP-1a ist an beiden Vorgängen beteiligt, jedoch in der Leber nur in geringeren Maßen vertreten (Shimomura *et al.*, 1997; Horton *et al.*, 2002). Reguliert wird das Geschehen über die Sterolsensitivität des SCAP, welches über ein negatives Feedback den Transport zur Aktivierung der SREBPs verhindert (Nohturfft, 1998; Brown und Goldstein, 1999). Somit führt ein Überschuss an Sterolen zu einer Unterdrückung der Eskortierung des SCAP/SREBP-Komplexes zum Golgi-Apparat und dadurch zur Hemmung der Produktion an Cholesterin. Davon betroffen sind hauptsächlich SREBP-1a und SREBP-2, da diese an der Cholesterinbiosynthese beteiligt sind. SREBP-1c

wird nach neuesten Studien über eine Insulinabhängigkeit gesteuert und bleibt von Sterolen weitestgehend unbeeinflusst (Shimano, 2001). Dies wird über spezielle im ER wirkende Proteine, den sogenannten *Insulin-induced genes*, Insig-1 und Insig-2, vermittelt (Rawson, 2003). Bei steigendem Insulin wird die Expression von SREBP-1c angeregt und fördert die Bildung neuer Triglyceride (Espenshade, 2006).

Fütterungsversuche haben gezeigt, dass durch einen Entzug von Nahrung bei Mäusen sowohl die Expression von SREBP-1c, SREBP-2, als auch ihrer Zielgene stark zurückgeht. Durch Wiederaufnahme einer kohlehydratreichen Fütterung stieg die Menge des SREBP-1c über das Ursprungsniveau an. Die SREBP-2-Expression nahm ebenfalls zu, jedoch nur bis zum Erreichen der Ausgangsmenge (Horton *et al.*, 1998). Ebenso konnte eine Zugabe mehrfach ungesättigter Fettsäuren zur Diät eine Reduktion von SREBP-1c und der Vorstufe des SREBP-2, sowie der Enzyme der Cholesterin- und Fettsäuresynthese bewirken (Worgall, 1998; Kim, 1999).

Nahrungskarenz und mehrfach ungesättigte Fettsäuren gelten ebenfalls als Aktivatoren des PPAR α -Systems (Kliwer *et al.*, 1997; Forman *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1999). In Studien zum gegenseitigen Einfluss von PPAR α und SREBPs konnte meist eine aktivierende Wirkung des PPAR α bei Ratte, Maus und Hamster festgestellt werden; man kam jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen (Roglans *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2001; Shiota *et al.*, 2003; Le Jossic-Corcus *et al.*, 2004; Knight *et al.*, 2005; König *et al.*, 2007). Auch gegensätzliche Resultate innerhalb derselben Tierart traten auf (Roglans *et al.*, 2001; König *et al.*, 2007). Luci *et al.* (2007a) untersuchten die Auswirkungen einer PPAR α -Aktivierung durch Clofibrat am Beispiel des Schweins. Hier kam man zu dem Ergebnis, dass die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen im Plasma durch die Behandlung vermindert waren. Ein Einfluss auf die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen der Leber und auf die Expression der SREBPs war allerdings nicht vorhanden (Luci *et al.*, 2007a). Studien am Menschen zeigten hierzu nur teilweise übereinstimmende Effekte (Vu-Dac *et al.*, 1995; Staels *et al.*, 1998a; Fernandez-Alvarez *et al.*, 2011). Somit ist anzunehmen, dass eine Übertragung der bisher bestehenden Erkenntnisse nicht problemlos auf andere Spezies vorgenommen werden kann und es für jede Tierart individueller Recherche bedarf.

2.5 Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) und die *Unfolded Protein Response* (UPR)

2.5.1 Regulationsmechanismen der UPR

Das ER ist ein multifunktionelles Zellorganell. Seine Aufgabe besteht in der Reifung (posttranslationale Modifikation, Faltung, Oligomerisierung) und Qualitätskontrolle von Transmembran- und sekretorischen Proteinen (Kaufman, 1999; Ellgaard und Helenius, 2003). Ferner findet hier die intrazelluläre Calcium-Speicherung und Bildung zellulärer Lipide und Sterole statt (Kaufman, 1999). Die Faltung der Proteine erfolgt mit Hilfe von so genannten Chaperonen (Schröder und Kaufman, 2005b). Die Hauptvertreter dieser Gruppe sind die Hitzeschockproteine (*Heat Shock Proteins*; HSP) und Enzyme der Familie der Proteindisulfidisomerasen (PDI) (Ellgaard und Helenius, 2003). Diese werden zusätzlich von Foldasen bei der Faltung der Proteine unterstützt (Schröder und Kaufman, 2005a).

Kommt es zum ER-Stress, der durch ein Ungleichgewicht zwischen Proteinaufkommen und Proteinfaltungskapazität im ER gekennzeichnet ist (Cnop *et al.*, 2012), muss eine Gegenreaktion zur Wiederherstellung des Gleichgewichts durch die Zelle eingeleitet werden, die sogenannte *Unfolded Protein Response* (UPR) (Kaufman, 1999; Schröder und Kaufman, 2005b; Ron und Walter, 2007; Cnop *et al.*, 2012; Hetz, 2012). Hierzu steigert die Zelle die Größe des ER, mindert die Translation neuer Proteine und bewirkt eine Steigerung der Faltungsleistung der Zelle (Schröder und Kaufman, 2005b). Ist die Zelle nicht in der Lage die Homöostase wieder herzustellen, leitet sie ihren Zelltod ein (Breckenridge *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2004). Das Wiedererreichen dieses Gleichgewichts ist notwendig, da zu große Mengen an un- und fehlgefalteten Proteinen durch Aggregatbildung Zellschäden hervorrufen können und zur Entstehung von schwerwiegenden Krankheiten beitragen (Barral *et al.*, 2004).

Bei Säugern existieren als Antwort auf den ER-Stress drei Regulationsmechanismen, bei denen jeweils ein Transmembranprotein an der Spitze der Regulationskaskade steht. Hierzu zählen IRE1 (*Inositol-requiring Kinase 1/ Endonuclease 1*), PERK (*PKR-like ER-Kinase/ Pancreatic ER Kinase*) und ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) (Kaufman, 1999; Schröder und Kaufman, 2005a; Ron und Walter, 2007; Todd *et al.*, 2008; Cnop *et al.*, 2012). Diese Transmembranproteine binden im physiologisch inaktiven Zustand mit ihrer ER-luminalen Domäne an das Chaperon HSPA5 (dargestellt in Abbildung 5a), welches auch unter den Bezeichnungen BiP (*Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein*) oder GRP78 (*Glucose Regulated Protein 78*) bekannt ist (Schröder und Kaufman, 2005b; Cnop *et al.*, 2012). Häufen

sich fehl- oder ungefaltete Proteine im ER an und kann der Sollzustand nicht durch die freien Chaperone wieder hergestellt werden, löst sich gebundenes HSPA5 von den Transmembranproteinen ab und leitet die Faltung der angefallenen Proteine ein (Gething, 1999). Diese Loslösung führt zum Ablauf der Reaktionskaskaden der jeweiligen Transmembranproteine (Xu *et al.*, 2005a), was in Abbildung 5b dargestellt ist. HSPA5 wird daher auch als Masterregulator der UPR bezeichnet (Hendershot, 2004).

ATF6 existiert in zwei Isoformen, ATF6 α und ATF6 β (Yoshida *et al.*, 2001b), wobei ATF6 β auch unter dem Namen CREB-RP/G13 (Haze *et al.*, 2001) bekannt ist. Im Geschehen der UPR scheint ATF6 β allerdings nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Thuerauf, 2004). Der dem ER-Lumen zugewandte Anteil des ATF6 besitzt zwei *Golgi Localisation Sequences* (GLS), die jedoch im inaktiven Zustand durch HSPA5 besetzt werden (Shen *et al.*, 2002). Nach Abwanderung von HSPA5 werden diese frei und ermöglichen die Translokation in den Golgi-Apparat (Todd *et al.*, 2008). Dort wird ATF6, entsprechend der SREBPs, durch die *Site-1*- und *Site-2*-Protease gespalten (Ye *et al.*, 2000), sodass das zur Transkription fähige bZIP-Fragment des ATF6 (ATF6f) frei wird (Shen *et al.*, 2004; Schröder und Kaufman, 2005a; Ron und Walter, 2007). Zusammen mit dem Transkriptionsfaktor NF-Y/CBF (Yoshida *et al.*, 2001b) bindet ATF6f im Kern an das ERSE-I (Yoshida, 1998) und -II (Kokame, 2000) (*ER Stress Response Element*) und bedingt die Transkription von Zielgenen. Hierzu zählen hauptsächlich Chaperone und Foldasen (Schröder, Kaufman, 2005a; van Huizen, 2003). Zusätzlich werden auch Gene wie *HERPUD1* (*Homocysteine-inducible, Endoplasmic Reticulum Stress-inducible, Ubiquitin-like Domain member 1*), *XBP-1* und *DDIT3* (*DNA-damage-inducible Transcript 3 (CHOP)*) durch ATF6 transkribiert (Schröder und Kaufman, 2005a; Yoshida *et al.*, 2000).

PERK ist ein Typ-I-Transmembranprotein mit einer Proteinkinase-Einheit seitens des Zytosol. Bei der Aktivierung durch die Ablösung von HSPA5 kommt es zur Oligomerisierung und trans-Autophosphorylierung von PERK-Molekülen (Kaufman, 1999; Ron und Walter, 2007; Todd *et al.*, 2008). Dies führt zu einer Phosphorylierung der α -Untereinheit von eIF2 (*eukaryotic translation initiating factor-2*) und verhindert infolgedessen die Biosynthese weiterer zu faltender Proteine (Harding *et al.*, 1999). Jedoch führt es nicht in allen Bereichen zu einer Blockade der Proteinsynthese, da die Phosphorylierung der eIF2 α -Untereinheit den inhibierenden *Open Reading Frame* von ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) umgeht und somit die Expression von ATF4 in hohem Maße zustande kommt (Vattem und Wek, 2004). ATF4 führt nun unter anderem zur Expression von Genen der Apoptose (DDIT3) (Harding *et al.*, 2000), Enzymen des *ER-Associated Degradation* (ERAD)-Systems (HERPUD) (Ma, 2004), sowie von ATF3 (*Activating Transcription Factor 3*) (Jiang *et al.*, 2004) und

PPP1R15A (*Protein phosphatase 1-15A (GADD34)*) (Ma, 2003). Letzterem ist es über die Dephosphorylierung des eIF2 α möglich, eine Inaktivierung dieses Proteins zu bewirken und somit zu einer Hemmung des eigenen Regulationsmechanismus zu führen (Ma, 2003). Ein ebensolches negatives Feedback geht von dem durch ATF6 und XBP1 induzierten Protein DNAJC3 aus, welches PERK an seiner Kinase-Domäne direkt blockieren kann (van Huizen, 2003).

Die letzte Achse im Geschehen der UPR bildet der Signalweg der IRE1. Dieser wurde zunächst bei Hefen, *Saccharomyces cerevisiae*, entdeckt und stellt dort die Signalantwort auf den ER-Stress dar (Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993). In der Evolution blieb diese Reaktionskaskade grundlegend erhalten, erfuhr jedoch einzelne komplexe Modifikationen. Die in der Hefe vorkommende IREp1 existiert in Säugetieren in zwei homologen Formen, der IRE1 α und IRE1 β (Tirasophon *et al.*, 1998; Wang, 1998), wobei das Vorkommen von IRE1 β nur auf Epithelzellen des Intestinaltraktes beschränkt ist (Bertolotti *et al.*, 2001). IRE1 α ist hingegen ubiquitär verbreitet (Tirasophon *et al.*, 1998).

IRE1, im Folgenden für die sowohl beim Säuger (IRE1 α), als auch bei der Hefe (IRE1p) vorkommende Form verwendet, ist eine weitere transmembrane Proteinkinase. Sie besitzt im Gegensatz zu PERK zusätzlich eine Endoribonuklease-Einheit am cytosolischen Anteil. Nach Aktivierung durch Loslösung von HSPA5 oder durch direkte Aktivierung über ungefaltete Proteine (Gardner und Walter, 2011) folgt eine Oligomerisierung und Autophosphorylierung der IRE1-Proteine (Schröder und Kaufman, 2005a; Todd *et al.*, 2008). Als Substrat für IRE1 ist bei Hefen die mRNA des HAC1 (*Homologous to ATF/CREB1*) (Cox und Walter, 1996), bei Säugern die des XBP1 (*X-Box Binding Protein 1*) (Yoshida *et al.*, 2001a; Calton *et al.*, 2002) bekannt.

Diese mRNA wird durch die Endoribonuklease-Einheit einem Spleißvorgang unterzogen, wobei ein Intron aus der Mitte der mRNA entfernt wird. Das Spleißen bedingt eine Leserasterverschiebung und führt nach Ligation und Translation zum transkriptionsfähigen HAC1_i (*HAC1_{induced}*) bzw. XBP1s (*XBP1_{spliced}*) (Patil und Walter, 2001; Shen *et al.*, 2004; Schröder und Kaufman, 2005a; Todd *et al.*, 2008). HAC1_i bzw. XBP1s kann nun in den Kern translozieren und die Expression der Zielgene mit einem ERSE oder UPRE (*Unfolded Protein Response Element*) in der Promotorregion einleiten (Yamamoto, 2004). Gene mit einem UPRE in ihrer Promotorregion sind vor allem Teil des ERAD (Yamamoto, 2004). Des Weiteren ist XBP1s an der Bildung von Chaperonen, Proteindisulfidisomerasen (PDI) und Foldasen (Lee *et al.*, 2003), sowie an der Phospholipidbiosynthese beteiligt (Cox *et al.*, 1997). XBP1 selbst besitzt ein UPRE in seinem Promotor, was zu einer vermehrten Bildung des eigenen Proteins

durch die XBP1-Aktivierung führt und die Antwort auf den ER-Stress aufrechterhält (Yoshida *et al.*, 2001a). Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass die ungespleißte Form des XBP1 (XBP1u) in der Lage ist, die Menge an induziertem XBP1s in Form eines inaktiven Komplexes zu vermindern. Dieser Komplex wird über das Proteasom-System abgebaut (Yoshida, 2006) und XBP1u fungiert somit als eine negative Regulationseinheit im ER-Stress.

Des Weiteren werden auch so genannte '*alarm stress*'-Wege (Hetz, 2012) eingeleitet. Beim Faltungsprozess von Proteinen entstehen ROS (Tu und Weissman, 2002), die während des Geschehens des ER-Stresses das Redox-System der Zelle beeinflussen. PERK induziert neben der Phosphorylierung des eIF2 α auch die Phosphorylierung des Nrf2 und vermindert das Aufkommen von ROS mit einer Aktivierung der antioxidativen Abwehr (Cullinan *et al.*, 2003). Zusätzlich wurde auch eine Aktivierung des NF- κ B beobachtet (Zhang und Kaufman, 2008). Dies kann einerseits durch die auftretenden ROS bedingt sein (Zhang und Kaufman, 2008), andererseits auch direkt über eine Aktivierung durch PERK (Deng *et al.*, 2004) oder IRE1 (Hu *et al.*, 2006) erfolgen und zu einer ER-Stress initiierten Entzündungsantwort führen.

Dies alles sind Mittel und Wege der Zelle, dem Aufkommen von un- und fehlgefalteten Proteinen entgegenzuwirken. Ist dies nicht möglich, wird der Weg der Apoptose eingeleitet (Breckenridge *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2004). Zentrale Rolle hierbei spielt DDIT3, dessen Expression durch die Signalwege von PERK und IRE1 eingeleitet wird (Tabas und Ron, 2011). DDIT3 veranlasst dabei unter anderem die Expression proapoptotischer und die Hemmung antiapoptotischer Proteine, die überwiegend Proteine der Bcl2 (*B-Cell Lymphoma 2*)-Familie und Caspasen beinhalten (Tabas und Ron, 2011; Woehlbier und Hetz, 2011). Auch IRE1 ist es möglich, über die Aktivierung der *Jun amino-terminal Kinase* (JNK) zur Einleitung des programmierten Zelltodes zu führen (Tabas und Ron, 2011).

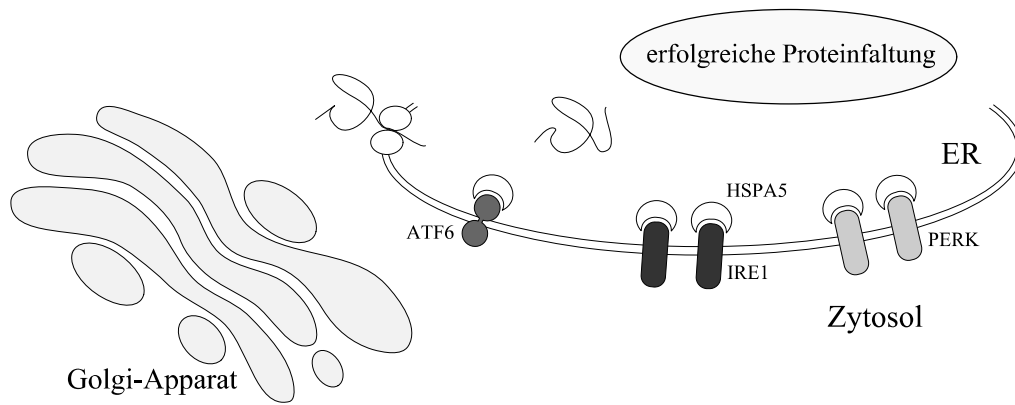


Abbildung 5a: Prinzip der Reaktionen auf ER-Stress. Unter physiologischen Bedingungen liegen die Transmembranproteine inaktiv an das Chaperon HSPA5 gebunden vor.
 Abkürzungen: *ATF6* Activating Transcription Factor 6; *ER* Endoplasmatische Retikulum; *HSPA5* Hitzeschockprotein A5; *IRE1* Inositol-requiring Kinase 1/ Endonuclease 1; *PERK* PKR-like ER-Kinase/ Pancreatic ER Kinase. Schema in Anlehnung an Todd *et al.* (2008).

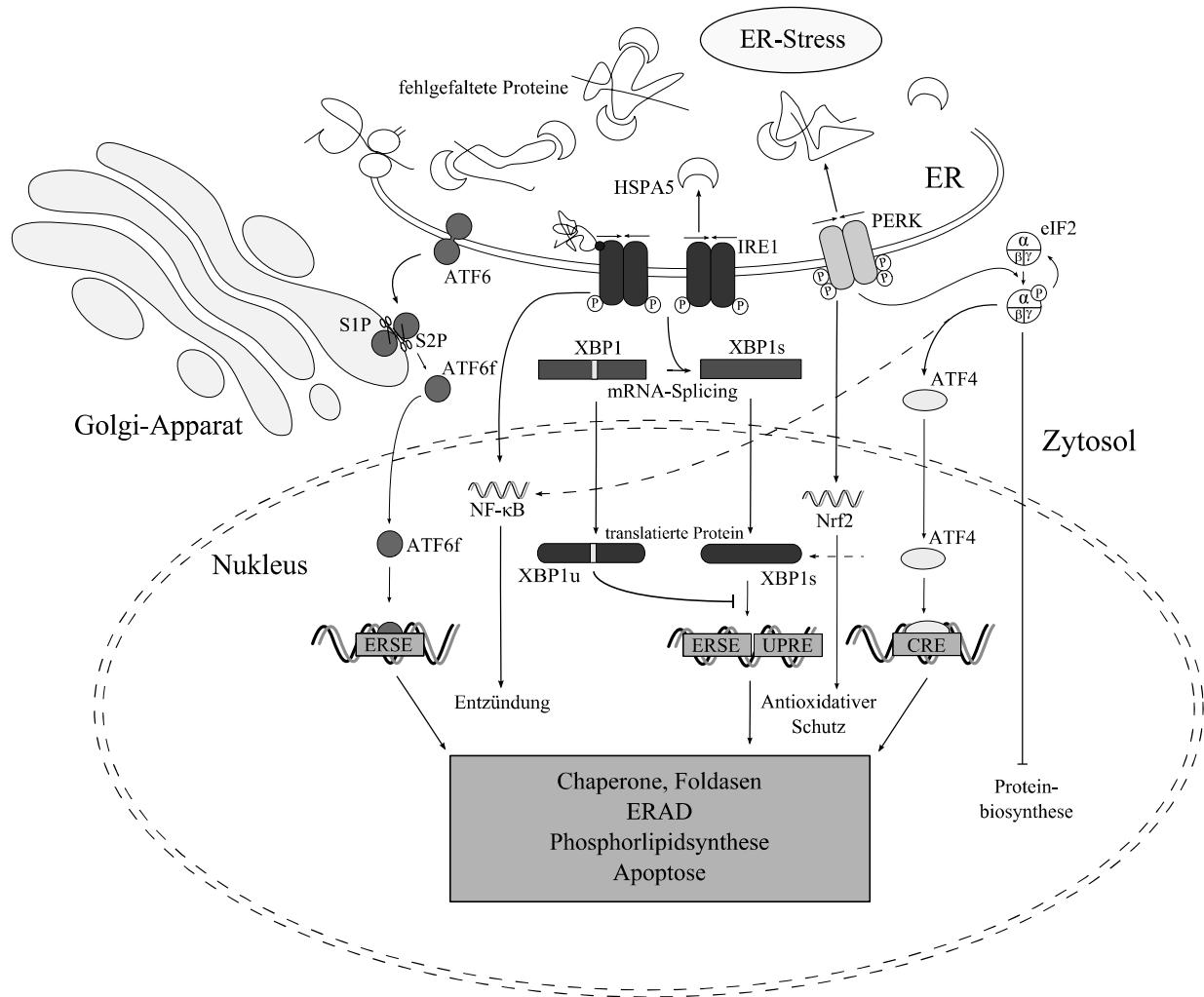


Abbildung 5b: Prinzip der Reaktionen auf ER-Stress. Kommt es zu einem erhöhten Vorkommen von un- oder fehlgefalteten Proteinen bindet HSPA5 an diese Proteine, löst sich aus seiner Bindung mit den Transmembranproteinen und leitet die UPR ein. IRE1 kann auch direkt durch ungefaltete Proteine aktiviert werden. ATF6 wandert nach Freisetzung der GLS, die durch HSPA5 blockiert war, zum Golgi-Apparat. Dort wird durch die Site-1- und Site-2-Protease der cytosolische Teil des ATF6 abgetrennt, was den aktiven transkriptionsfähigen Teil des ATF6 (ATF6f) darstellt. ATF6f wandert nun in den Kern, bindet an das ERSE und kann die Transkription seiner Zielgene veranlassen. IRE1 oligomerisiert und autophosphoryliert nach Aktivierung. Über seine Endonuclease-Einheit spleißt es die mRNA von XBP1, wodurch die XBP1s-mRNA entsteht. Durch eine Leserasterverschiebung ist das translatierte Protein fähig in den Nukleus zu wandern, an das ERSE oder UPRE zu binden und die Transkription seiner Zielgene zu veranlassen. Das ungespleißte XBP1u-Protein kann die Transkriptionsaktivität von XBP1s hemmen. IRE1 kann gegebenenfalls JNK aktivieren und zur Apoptose führen. Bei dem Transmembranprotein PERK kommt es nach Lösung von HSPA5 ebenfalls zur Oligomerisation und Autophosphorylierung. Über die Phosphorylierung der α -Untereinheit des eIF2 führt es zum Erliegen der Translation. Jedoch erfährt ATF4 durch die Phosphorylierung des eIF2 α eine erhöhte Expression. Es kann somit in den Kern wandern und die Transkription seiner Zielgene induzieren. Des Weiteren kann PERK durch die Phosphorylierung des Nrf2 zur Aktivierung der antioxidativen Abwehr führen. Darüber hinaus bedingt PERK als auch IRE1 eine Aktivierung des NF- κ B und bewirkt eine Induktion der Entzündungskaskade als Reaktion auf den ER-Stress. Einleitung der UPR führt zur Bildung von Faltungsproteinen, Aktivierung des Proteinabbaus durch ERAD und zur Induktion der Phospholipidbiosynthese. Führen diese Maßnahmen nicht zur Wiederherstellung der ER-Homöostase, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet.

Abkürzungen: *ATF4* Activating Transcription Factor 4; *ATF6* Activating Transcription Factor 6; *ATF6f* ATF6fragment; *CRE* cAMP Response Element; *ER* Endoplasmatisches Retikulum; *eIF2* Eukaryotic Translation Initiating Factor-2; *ERAD* ER-associated Degradation; *ERSE* ER Stress Response Element; *HSPA5* Hitzeschockprotein A5; *IRE1* Inositol-requiring Kinase 1/ Endonuclease 1; *NF- κ B* Nuclear Factor κ B; *Nrf2* Nuclear Factor-erythroid 2-related Factor-2; *PERK* PKR-like ER-Kinase/ Pancreatic ER Kinase; *PDI* Proteinindisulfidisomerasen *SIP* Site-1 Protease; *S2P* Site-2 Protease; *XBP1* X-Box Binding Protein 1; *XBP1s* XBP1spliced; *XBP1u* XBP1unspliced. Schema in Anlehnung an Todd *et al.* (2008).

2. 5. 2 Möglichkeit der Beeinflussung des ER-Stresses durch PPAR α

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass ER-Stress an der Entstehung von Krankheiten wie unter anderem Morbus Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Diabetes mellitus oder familiärer Amyloidose beteiligt ist (Barral *et al.*, 2004; Eizirik *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010). Durch Steigerung der Chaperonaktivität konnten bereits signifikante Behandlungserfolge in der Therapie verzeichnet werden (Muchowski *et al.*, 2000; Cummings, 2001; Sittler, 2001). Studien zur Wirkung von PPAR α -Aktivatoren auf das Geschehen des ER-Stresses liegen nur in geringem Maße vor.

Han *et al.* (2008) konnten zeigen, dass Macelignan, ein Extrakt des Muskatnussbaumes, eine antidiabetogene Wirkung besitzt. Macelignan ist ein Agonist der beiden Rezeptoren PPAR α und γ . Es wurde auch auf eine ER-Stress-reduzierende Wirkung hin untersucht, welche auch bewiesen werden konnte. Ein reiner PPAR γ -Agonist führt jedoch zu keinem nennenswerten Effekt (Han *et al.*, 2008). Ferner konnte in einer weiteren Studie bewiesen werden, dass die Aktivierung des PPAR α zu einer Hemmung des ER-Stresses in HepG2-Zellen führte und sogar die durch ER-Stress bedingte Apoptoserate vermindert werden konnte (Tang *et al.*, 2014).

Daher stellt die ER-Stress-hemmende Wirkung von PPAR α -Agonisten einen interessanten Ansatzpunkt für die Behandlung von ER-Stress-bedingten Erkrankungen und deren Auswirkungen dar.

2. 6 Das Ubiquitin-Proteasom-System

2. 6. 1 Das Ubiquitin-Proteasom-System im Verlauf des Muskelabbaus

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), welches schon in obigen Signalwegen erwähnt wurde, stellt eine wichtige Art des Proteinabbaus dar (Hershko und Ciechanover, 1998). Hierzu gehören neben Rezeptoren, Transportern und regulatorischen Proteinen (Epstein *et al.*, 1996; Hershko und Ciechanover, 1998) auch fehlgefaltete Proteine, die die Qualitätskontrolle der Zelle nicht überstehen (Ellgaard und Helenius, 2003). Ebenso ist der Abbau muskulären Proteins eine Aufgabe des UPS (Hershko und Ciechanover, 1998; Taillandier *et al.*, 2004; Attaix *et al.*, 2003). Des Weiteren sind sowohl Signalwege über Lysosomen, Caspasen und Matrixmetalloproteinasen, als auch der Ca²⁺-abhängige Signalweg bei der Proteolyse bekannt, die jedoch nur einen geringen Teil des Muskelabbaus ausmachen (Attaix *et al.*, 2003; Taillandier *et al.*, 2004).

In Phasen stark negativer Energiebilanz oder schwerwiegender Krankheitszustände werden aus der Muskulatur als Hauptspeicherort vermehrt Proteine zur Energiegewinnung genutzt (Attaix *et al.*, 2003; Tisdale, 2005). Auch während der Laktation werden ebensolche kontraktile Proteine verbraucht, um eine ausreichende Milchproduktion zu gewährleisten (Clowes *et al.*, 2005).

Grundlegend für den Prozess des Proteinabbaus über das UPS ist das Vorhandensein von ATP, da ohne diesen Energielieferant der Ablauf des Vorgangs nicht möglich wäre (Epstein *et al.*, 1996). Zudem sind verschiedene Enzyme notwendig, darunter das Ubiquitin-aktivierende (E1) Enzym, wie auch die Ubiquitin-konjugierenden (E2) und -ligierenden (E3) Enzyme. Diese sind Teil einer Kaskade, über die abzubauen Proteine mit Ubiquitin verknüpft und über das 26S-Proteasom abgebaut werden. Das hochaktive E1-Enzym aktiviert Ubiquitin über den Verbrauch von ATP. Das E1-Enzym überträgt im Folgenden die aktivierten Ubiquitinmoleküle auf verschiedene E2-Enzyme, welche Ubiquitin mit den abzubauen Proteinen verknüpfen (Hershko und Ciechanover, 1992; Attaix *et al.*, 2003; Taillandier *et al.*, 2004; Tisdale, 2005). Nur nach Polyubiquitinierung mit mindestens vier Ubiquitinmolekülen durch die E3-Enzyme, kann das Protein über das UPS abgebaut werden (Thrower, 2000). Einfach oder doppelt ubiquitinierte Proteine werden durch Lysosome abgebaut (Tisdale, 2005; Wing, 2005). E3-Enzyme sind befähigt ihre spezifischen Proteinsubstrate zu erkennen (Attaix *et al.*, 2003). Ebenfalls existieren gewisse E2-E3-Enzymkombinationen, die miteinander interagieren und für bestimmte Substrate zuständig sind (Taillandier *et al.*, 2004; Wing, 2005).

Nach Ablauf dieser Markierungskaskade wird das polyubiquitinierte Protein durch das 26S-Proteasom erkannt. Das Proteasom besteht aus einem zentralen tunnelförmigen 20S-Proteasom und zwei anhängenden 19S-Regulationseinheiten (Glickman und Ciechanover, 2002). Das 20S-Proteasom besteht aus vier gestapelten Ringen, die jeweils aus sieben α - oder β -Untereinheiten aufgebaut sind (Attaix *et al.*, 2003). Die α -Untereinheiten bilden die beiden äußeren, die β -Untereinheiten die beiden inneren Ringe, wobei die inneren Ringe eine katalytische Funktion besitzen (Attaix *et al.*, 2003). Die 19S-Untereinheiten erkennen die markierten Proteine, recyceln das Ubiquitin und entfalten die Proteine, da nur aufgefaltete Proteine in das Proteasom eintreten können (Epstein *et al.*, 1996). Dieser Vorgang benötigt erneut Energie in Form von ATP (Lecker *et al.*, 1999a).

Das Proteasom baut die Proteine nun zu kleineren Peptiden ab, welche durch die Tripeptidpeptidase II zu Tripeptiden und anschließend durch Aminopeptidasen in ihre einzelne Aminosäuren zerlegt werden (Taillandier *et al.*, 2004; Attaix *et al.*, 2005; Tisdale, 2005).

In Studien zu erhöhtem Muskelabbau wurden vermehrte Expressionsraten von Ubiquitin (Wing und Goldberg, 1993; Llovera *et al.*, 1994; Temparis *et al.*, 1994; Tiao *et al.*, 1994; Medina *et al.*, 1995; Price *et al.*, 1996) und den E2-Enzymen UBE2B (*Ubiquitin-conjugating Enzyme E2B* oder auch E2_{14k}) (Temparis *et al.*, 1994; Wing und Banville, 1994; Hobler *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2000; Kee *et al.*, 2003) und UBE2H (*Ubiquitin-conjugating Enzyme E2H* oder E2_{20k}) (Li *et al.*, 2003) gefunden. Auch waren die Untereinheiten des Proteasoms vermehrt exprimiert (Price *et al.*, 1994; Temparis *et al.*, 1994; Medina *et al.*, 1995; Voisin *et al.*, 1996). Das E1-Enzym erfährt durch seine hohe Aktivität keine erhöhte Expression bei gesteigertem Muskelabbau (Lecker *et al.*, 1999b). Ubiquitin wird zwar vermehrt transkribiert, jedoch konnte gezeigt werden, dass es kein alleiniger Marker für erhöhte Proteolyse darstellt, da auch erhöhte mRNA-Mengen bei unverändertem Proteinabbau in der Muskulatur gemessen werden konnten (Dardevet *et al.*, 1995). Des Weiteren konnten auch gesteigerte Konzentrationen von den E3-Ligasen F-box Protein 32 (FBXO32, auch bekannt als Atrogin-1) (Bodine *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001), UBR1 (*Ubiquitin Protein Ligase E3 Component n-recognin 1*, auch E3 α genannt) (Fischer *et al.*, 2000) und *Tripartite Motif Containing 63*, (kurz TRIM63 oder auch MuRF-1 (*Muscle RING-finger Protein-1*)) (Bodine *et al.*, 2001) gemessen werden. Dem Fehlen dieser beiden E3-Ligase konnte in Knockout-Versuchen eine Resistenz gegen den muskulären Proteinabbau nachgewiesen werden (Bodine *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001) und sind daher essentielle Faktoren des Muskelabbaus.

Studien vergangener Jahre konnten zeigen, dass am Prozess des Muskelabbaus durch das UPS auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B beteiligt ist. Jedoch zeigten sich hier widersprüchliche Ergebnisse. Du (2000) konnte aufzeigen, dass durch Glukokortikoide eine Aktivierung des UPS durch die Inhibierung des NF- κ B erfolgt (Du, 2000).

Dem entgegen bewiesen Cai *et al.* (2004), dass es durch kachektische Faktoren zu einer Aktivierung der IKK β kommt und diese die Freisetzung des NF- κ B induziert. Durch die Aktivierung des NF- κ B kam es zu einer erhöhten Expression von TRIM63, was auf eine Einleitung des UPS durch den NF- κ B hindeutet (Cai *et al.*, 2004). Auch Whitehouse und Tisdale (2003) konnten die Induktion des UPS durch den NF- κ B bestätigen (Whitehouse und Tisdale, 2003).

2. 6. 2 Interaktion von PPAR α und UPS

Studien, die eine Interaktion des PPAR α und des Signalweges des UPS beschreiben, sind bisher nur wenige vorhanden. Neben der Wirkung des PPAR α auf den Lipid- und

Glukosemetabolismus konnten einzelne Untersuchungen eine proteolytische Nebenwirkung bei der Behandlung mit PPAR α -Agonisten beobachten (Delangre *et al.*, 1990; Terrovitou *et al.*, 1998; Hodel, 2002). Auf Grundlage dessen untersuchten Ringseis *et al.* (2013) gezielt die Wirkung von PPAR α -Agonisten auf das UPS. Sie konnten erstmals feststellen, dass diese zu einer Induktion der beiden E3-Ligasen FBXO32 und TRIM63 führten und ein erhöhter Verbrauch an muskulären Proteinen stattfand. Jedoch schien dies nicht auf einer direkten Umsetzung der beiden E3-Ligasen durch ein PPRE in der Promotorregion zu basieren, sondern über eine indirekte Aktivierung des Transkriptionsregulator von FBXO32 und TRIM63 zu erfolgen (Ringseis *et al.*, 2013).

3 Zielstellung

Es ist bekannt, dass Nager und Rinder unterschiedliche Anpassungsmechanismen während der Laktation aufweisen (Loor *et al.*, 2005, 2006, 2007; Gutgesell *et al.*, 2009; McCarthy *et al.*, 2010). Nager reagieren mit einer Unterdrückung der Aktivität des PPAR α , was über seine Wirkung auf den Lipidmetabolismus und der Thermogenese zu einer Einsparung von Energie führt, welche dann in der Milchsynthese genutzt wird (Gutgesell *et al.*, 2009). Milchkühe reagieren dem gegenüber mit einer Stimulation des PPAR α (Loor *et al.*, 2005). Durch eine induzierte Aktivierung des PPAR α durch die Verabreichung von oxidierten Fetten konnte bei Ratten ein erhöhter Verbrauch an Fettsäuren in der Leber mit einer verminderten Verfügbarkeit dieser Fettsäuren für die Milchproduktion beobachtet werden (Ringseis *et al.*, 2007). Dies resultierte in einer Minderversorgung der Nachkommen mit Triglyceriden und einer daher bedingten Beeinträchtigung ihrer Entwicklung (Ringseis *et al.*, 2007).

Es wurde kürzlich in der eigenen Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass Sauen im Gegensatz zu Ratten während der Laktation mit einer Aktivierung des PPAR α in der Leber reagieren (Rosenbaum, 2012a). Hierbei zeigten die mit diesem Rezeptor einhergehenden Stoffwechselwege der Carnitinsynthese und -aufnahme, der β -Oxidation, des Fettsäuretransfer und der Thermogenese einen erhöhten Umsatz (Rosenbaum *et al.*, 2012a, 2013). Des Weiteren wurde beobachtet, dass während der Laktation eine Stimulation der beiden Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Nrf2 auftritt (Rosenbaum *et al.*, 2012a, 2012b), was auf eine den Milchkühen ähnliche anpassungsbedingte Entzündungsreaktion mit einer Aktivierung der antioxidativen Abwehr *post partum* in der Leber vermuten lässt (Loor *et al.*, 2005, 2006).

Der vorliegenden Arbeit liegen zwei Versuche zugrunde. Im erste Versuch soll, zusätzlich zu den bereits genannten Erkenntnissen, untersucht werden, ob durch das Entzündungsgeschehen während der Laktation eine Aktivierung der UPR durch vermehrt aufkommenden ER-Stress in der Leber auftritt. Um zusätzlich neben der Leber auch andere Organe zu erfassen, soll auch die Muskulatur auf eine Aktivierung der UPR untersucht werden. Es gibt ebenfalls Hinweise darauf, dass der PPAR α an der Regulation der SREBPs (Roglans *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2001; Shiota *et al.*, 2003; Knight *et al.*, 2005; König *et al.*, 2007) mit deren Einfluss auf die Triglycerid- und Cholesterinsynthese und an Genen des UPS zum muskulären Proteinabbau (Ringseis *et al.*, 2013) beteiligt ist, wodurch auch diese Stoffwechselwege auf laktationsbedingte Veränderungen bei Sauen untersucht werden sollen.

Im zweiten Versuch soll auf Grundlage der oben genannten Ergebnisse und Untersuchungen eine experimentell induzierte Aktivierung des PPAR α durchgeführt und die Auswirkung dieser Aktivierung auf die oben genannten Stoffwechselwege beobachtet werden.

Da bekannt ist, dass Fischöl mit hohen Anteilen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Clofibrat als synthetischer Agonist und Energierestriktion durch die Anflutung von Fettsäuren zu einer Aktivierung des PPAR α führen (Kersten *et al.*, 1999; Berger und Moller, 2002; Mandard *et al.*, 2004), wurden diese drei unterschiedlichen Aktivierungswege für den zweiten Versuch ausgewählt.

Im Rahmen des zweiten Versuchs sollen zunächst typische PPAR α -Zielgene in ihrer Expression in verschiedenen Geweben untersucht werden, um den Erfolg der PPAR α -Aktivierung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erfassen. Des Weiteren werden auch hier die Auswirkungen der Behandlungen mittels Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion über den PPAR α auf den Stoffwechselweg der SREBPs und auf Gene des UPS, die für proteolytische Enzyme kodieren, untersucht.

Aufgrund der Studie von Rosenbaum *et al.* (2012a), die Hinweise auf eine anpassungsbedingte Entzündungsreaktion bei Sauen in der Laktation lieferte, soll darüber hinaus untersucht werden, ob die Behandlungen mittels Fischöl, Clofibrat in Leber und Muskulatur eine antiinflammatorische Wirkung zeigen und ob in Folge dessen die UPR aufgrund reduzierten ER-Stresses und die Aktivität des Nrf2 vermindert werden kann. Für Fischöl ist bereits eine antiinflammatorische Wirkungsweise bekannt (Calder und Grimble, 2002; Calder, 2012), ebenso liegen Studien über entzündungshemmende Effekte vor, die über den PPAR α vermittelt werden sollen (Delerive, 2002), was den Hintergrund zu obiger Fragestellung beschreibt. Durch die Reduktion der Energiezufuhr soll überprüft werden, ob die in der Laktation auftretende Entzündungsreaktion durch die negative Energiebilanz hervorgerufen wird.

Da es bei Ratten, wie zu Beginn beschrieben, durch eine PPAR α -Aktivierung zu einem Einbruch in der Milchfettsynthese kommt und dies zu einer Minderversorgung und Beeinträchtigung der Entwicklung der Nachkommen führt (Ringseis *et al.*, 2007), soll in der zweiten Teilstudie auch die Zusammensetzung der Milch in Folge der Behandlungen mittels Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion untersucht werden. Dies soll Aufschluss darüber geben, ob es auch bei der Sau zu einer derartigen Veränderung in der Milchezusammensetzung aufgrund einer Aktivierung des PPAR α kommt und ob es ebenfalls mit einer Beeinträchtigung des Ferkelwachstums einhergeht.

4 Material und Methoden

Der vorliegenden Arbeit liegen zwei Versuchansätze zugrunde. Im Fokus des ersten Versuchs standen die Auswirkungen der Laktation auf ausgewählte Stoffwechselwege. Dies wurde durch den Vergleich einer laktierenden gegenüber einer nicht-laktierenden Kontrollgruppe realisiert. Der zweite Versuch beschäftigte sich mit der Wirkung der Behandlungen mittels Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe während der Laktation auf ausgewählte Stoffwechselwege.

Die Versuche wurden durch das Regierungspräsidium Gießen unter der Zulassungsnummer GI 19/3-No. 29/2010 genehmigt und fanden auf der Lehr- und Forschungsstation 'Oberer Hardthof' der Justus-Liebig-Universität Gießen, Oberer Hardthof 25, 35398 Gießen statt.

4.1 Versuch 1

4.1.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Im ersten Versuch wurden 20 Sauen ausgewählt, die bereits eine Trächtigkeit durchlaufen hatten. Sie gehörten den Rassen '*Deutsches Edelschwein*' und '*Deutsche Landrasse*' an und wurden gleichmäßig in zwei Gruppen zu je zehn Tieren eingeteilt. Nach erfolgreicher künstlicher Besamung mit Sperma von Ebern gleicher Rassen wurden die Sauen bis zum 21. Tag der Trächtigkeit in Einzelhaltung gehalten. Anschließend wurden sie bis zum 110. Trächtigkeitstag in Gruppen eingestallt. Ab Tag 110 wurden sie zur Geburt einzeln in Abferkelboxen gehalten.

24 Stunden nach der Geburt wurde den Sauen der ersten Gruppe alle Ferkel entzogen, um die Milchproduktion zum Erliegen zu bringen und eine nicht-laktierende Kontrollgruppe zu erhalten. In der zweiten Gruppe wurden die Würfe auf zwölf Ferkel mit gleichem Entwicklungszustand standardisiert. Die Sauen und ihrer Ferkel wurden jeweils im wöchentlichen Rhythmus nach dem Abferkeln gewogen. *Post partum* wurde über dem Bereich der Ferkel eine Rotlichtquelle angebracht, die eine konstante Temperatur von 35 °C erzeugte. Im Bereich der Sauen wurde für eine Temperatur von 19 ± 1 °C und einer relativen Luftfeuchte von 60-80 % über eine automatische Klimaanlage gesorgt. Das Lichtregime wurde mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden eingestellt. Die Säugezeit betrug 20 ± 1 Tage.

Versuch 1 stellte bereits die Grundlage der Promotionsarbeit von S. Rosenbaum (2013) dar. Details wurden bereits in den Publikationen Rosenbaum *et al.* (2012a, 2012b, 2013) beschrieben.

4. 1. 2 Fütterung

Während der Trächtigkeit erhielten die Sauen Futter *ad libitum* mit einem Energiegehalt von 12,2 MJ ME/kg, das in der institutseigenen Futtermischanlage hergestellt wurde (Tab. 1). Ab dem Geburtszeitpunkt erhielten sie ein ausgewogenes, individuell in der Menge nach dem Energiebedarf angepasstes Laktationsfutter mit einem Energiegehalt von 13,0 MJ ME/kg (Tab. 1). Die Zusammensetzung des Futters orientierte sich an den Empfehlungen der GfE (2006) für laktierende Sauen. Nicht aufgenommenes Futter wurde rückgewogen, um die jeweilige tägliche Futteraufnahme zu erhalten. Alle Tiere hatten über Nippeltränken freien Zugang zu Wasser.

Grundkomponenten des Futters während der Trächtigkeit stellten Gerste, Weizen und Sojaextraktionsschrot dar. Als Energie- und Fettgrundlage wurde der Ration Sojaöl hinzugefügt und zur Mineralstoff und Vitaminversorgung das Mineralfuttermittel Fasersan Trag[®] (Sano-Moderne Tierernährung GmbH, Loiching) verwendet (Tab. 1).

Im Laktationsfutter wurden die gleichen Grundkomponenten verwendet. Auch hier wurde Sojaöl als Fettgrundlage zugesetzt. Zum Ausgleich von Mineralien, Vitaminen und Aminosäuren wurde das Mineralfuttermittel Sauengold Lac[®] (Sano-Moderne Tierernährung GmbH, Loiching) zugefügt.

Eine Übersicht über Zusammensetzung der verwendeten Futterrationen ist in Tabelle 1 zu finden.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Futterrationen von Versuch 1

	Trächtigkeitsfutter	Laktationsfutter
Anteile (g/kg):		
Gerste	705	350
Weizen	160	440
Sojaextraktionsschrot	80	160
Sojaöl	5	15
Mineralfutter	50*	35**
Umsetzbare Energie° (MJ/kg)		
	12,2	13,0
Nährstoffe° (%):		
Trockenmasse	87,5	87,5
Rohprotein	12,3	15,9
Rohfett	2,3	3,2
Rohasche	5,1	5,9
Rohfaser	5,7	3,8
Stärke	46,8	45,6
Mineralstoffe° (g/kg):		
Calcium	7,1	7,9
Phosphor (praecaecal verdaulich -pcv)	2,1	2,8
Natrium	2,1	2,2
Aminosäuren ° (g/kg):		
Lysin (pcv)	5,8	8,5
Methionin + Cystein (pcv)	4,1	5,5
Methionin (pcv)	2,1	3,1
Threonin (pcv)	4,8	4,8
Tryptophan (pcv)	1,3	1,7
Lys/Met+Cys/Thr/Trp-Verhältnis (pcv)	1 : 0,7 : 0,8 : 0,2	1 : 0,6 : 0,6 : 0,2

* Fasersan Trag[®]. Vitamin- und Mineralstoffgehalte pro kg Futter: 12.500 I. E. Vit. A, 2000 I. E. Vit. D3, 120 mg Vit. E, 2,5 mg Vit. K3, 1,5 mg Vit. B1, 3,75 mg Vit. B2, 2,5 mg Vit. B6, 25 µg Vit. B12, 9,25 mg Panthothensäure, 20 mg Nicotinsäure, 350 µg Folsäure, 250 µg Biotin, 500 mg Cholinchlorid, 100 mg Eisen, 110 mg Zink, 75 mg Mangan, 10 mg Kupfer, 2 mg Iod, 400 µg Kobald, 400 µg Selen, 1625 mg L-Lysin, 250 mg DL-Methionin, 750 FYT 6-Phytase.

** Sauengold Lac[®]. Vitamin- und Mineralstoffgehalte pro kg Futter: 13.475 I. E. Vit. A, 1.995 I. E. Vit. D3, 140 mg Vit. E, 3,5 mg Vit. K3, 2,1 mg Vit. B1, 5,3 mg Vit. B2, 3,5 mg Vit. B6, 35 µg Vit. B12, 12,25 mg Panthothensäure, 28 mg Nicotinsäure, 420 µg Folsäure, 525 µg Biotin, 700 mg Cholinchlorid, 140 mg Eisen, 109,9 mg Zink, 108,5 mg Mangan, 10,0 mg Kupfer, 2,6 mg Iod, 525 µg Kobald, 350 µg Selen, 2695 mg L-Lysin, 875 mg DL-Methionin, 175 mg L-Threonin, 752,5 FYT 6-Phytase.

° berechnet mit HYBRIMIN[®] Futter 2008 (Version 3.1.9. de 4.5.3.) von Hybrimin Computer + Programme GmbH Co. KG, Hessisch Oldendorf

4.2 Versuch 2

4.2.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Für den zweiten Versuch wurden 40 tragenden Sauen ausgewählt, die sich in ihrer zweiten oder dritten Trächtigkeit befanden. Hierbei wurden die Sauen in vier Gruppen eingeteilt. Es wurden ebenfalls die Rassen '*Deutsches Edelschwein*' und '*Deutsche Landrasse*' ausgewählt und allen Gruppe fünf Tiere jeder Rasse zugeordnet.

Nach der Geburt wurden die Würfe auf acht Ferkel mit gleichem Entwicklungszustand standardisiert, um eine negative Energiebilanz auf Seiten der Sauen durch zu große Würfe zu vermeiden. Kümmerer wurden entfernt und durch entsprechende überzählige Ferkel anderer Würfe oder von versuchsfremden Sauen ersetzt. Somit konnte eine Beeinflussung des Energieverbrauchs der Sau durch unterschiedliche Wurfgrößen und Inhomogenität des Wurfs ausgeschlossen werden. Auch hier wurde eine wöchentliche Überprüfung der Gewichtsentwicklung vorgenommen. Die Säugeperiode betrug ebenfalls 20 ± 1 Tage, wobei die Ferkel ab dem 14. Lebenstag mit kommerziellem Saugferkelbefutter (Bonni M-Forte, Sano-Moderne Tierernährung) zugefüttert wurden. *Post partum* wurde der Bereich der Ferkel wie im ersten Versuch mit einer Rotlichtquelle ausgestattet. Die Bedingung der Temperatur und Luftfeuchte im Abferkelstall entsprachen Versuch 1. Das Lichtregime wurde ebenfalls mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden eingestellt.

4.2.2 Fütterung

Alle Sauen erhielten ab dem Geburtszeitpunkt ein ausgewogenes Laktationsfutter mit einem Energiegehalt von 13,8 MJ ME/kg. Ebenso wie in Versuch 1 wurde die Futtermenge entsprechend ihres Energiebedarfs angepasst. Die Zusammensetzung des Futters orientierte sich ebenfalls an den Empfehlungen der GfE (2006) für laktierende Sauen. Auch wurden sie separat gehalten, um die Aufnahme des Futters durch die einzelnen Sau sicherzustellen. Am Tag der Abferkelung erhielten die Sauen ca. 3 kg Futter, an den folgenden Tagen wurde die gesamte berechnete Menge bereitgestellt. Nicht aufgenommenes Futter wurde rückgewogen, um die jeweilige tägliche Futteraufnahme zu erhalten. Alle Tiere hatten über Nippeltränken freien Zugang zu Wasser.

Das Laktationsfutter (Kontrollfutter) basierte ebenfalls auf den Grundkomponenten Gerste, Weizen und Sojaextraktionsschrot (Tab. 3). Zum Ausgleich von Mineralien, Vitaminen und

Aminosäuren wurde auch hier das Mineralfuttermittel Sauengold Lac[®] (Sano-Moderne Tierernährung GmbH, Loiching) verwendet. Als Energie- und Fettgrundlage wurde der Ration eine Mischung aus Soja- und Palmöl zugesetzt, welche die Gruppen 1, 3 und 4 erhielten. Gruppe 1 diente als Kontrollgruppe. Gruppe 2 erhielt anstatt Palm- und Sojaöl eine analoge Menge an Fischöl der Fa 'Henry Lamotte (Bremen)' mit einem Anteil von 34 % Omega-3-Fettsäuren. Palm- und Sojaöl stammen ebenfalls von der Fa. 'Henry Lamotte (Bremen)'. Der Diät der Gruppe 3 wurde außerdem Clofibrat der Fa. 'Fluka (Buchs, Schweiz)' in einer Dosis von 2 g/kg Futter zugesetzt. Bei Gruppe 4 wurde eine Energierestriktion um 25 % des täglichen Energiebedarfs vorgenommen. Eine Übersicht über Fütterung und Details der Rationen ist in Tabelle 2 und 3 zu finden. Tabelle 4 zeigt die Tocopherolgehalte, Tabelle 5 das Fettsäuremuster des Futters der Kontroll- und Fischölgruppe. Die Gehalte an Tocopherolen und das Fettsäuremuster des Futters der Clofibratgruppe sind nicht angegeben, sie entsprachen den Werten des Futters der Kontrollgruppe.

Tabelle 2: Übersicht über die Fütterung der Gruppen in Versuch 2

Gruppen	1 Kontrolle	2 Fischöl	3 Clofibrat	4 Energierestriktion
Laktationsfutter*	+	+	+	+
4 % Palmöl, 1 % Sojaöl	+	-	+	+
5 % Fischöl	-	+	-	-
Clofibrat	-	-	+	-
Deckung des Energiebedarfs	100 %	100 %	100 %	75 %

*Details über die Zusammensetzung sind in Tabelle 3 zu finden.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Laktationsfutters (Kontrollfutter) in Versuch 2

	Laktationsfutter (Kontrollfutter)
Anteile (g/kg):	
Gerste	325
Weizen	400
Sojaextraktionsschrot	190
Soja- und Palmöl*	50
Sauengold Lac® **	35
Umsetzbare Energie (MJ/kg)^	13,8
Nährstoffe° (%):	
Trockenmasse	88,9
Rohprotein	15,4
Rohfett	7,4
Rohasche	4,3
Rohfaser	4,5
Stärke	39,5
Mineralstoffe°° (g/kg):	
Calcium	8,0
Phosphor (pcv)	2,8
Natrium	2,2
Aminosäuren °° (g/kg):	
Lysin (pcv)	9,0
Methionin + Cystein (pcv)	5,6
Methionin (pcv)	3,2
Threonin (pcv)	5,0
Tryptophan (pcv)	1,7
Lys/Met+Cys/Thr/Trp-Verhältnis (pcv)	1 : 0,6 : 0,6 : 0,2

* 4 % Palmöl, 1 % Sojaöl

** Vitamin- und Mineralstoffgehalte pro kg Futter: 13.475 I. E. Vit. A, 1.995 I. E. Vit. D3, 140 mg Vit. E, 3,5 mg Vit. K3, 2,1 mg Vit. B1, 5,25 mg Vit. B2, 3,5 µg Vit. B6, 35 mg Vit. B12, 12,25 mg Panthothensäure, 28 mg Nicotinsäure, 0,42 µg Folsäure, 525 mg Biotin, 700 mg Cholinchlorid, 140 mg Eisen, 109,9 mg Zink, 108,5 µg Mangan, 9,975 mg Kupfer, 2,625 g Iod, 525 µg Kobalt, 1,05 mg Selen, 3695 mg L-Lysin, 875 mg DL-Methionin, 175 mg L-Threonin, 752,5 FYT 6-Phytase.

^ berechnet anhand der Schätzformel für Mischfuttermittel für Schweine der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE 2008)

° analysiert (Mittelwert von vier Analysen pro Diät)

°° berechnet mit HYBRIMIN® Futter 2008 (Version 3.1.9. de 4.5.3.) von Hybrimin Computer + Programme GmbH Co. KG, Hessisch Oldendorf

Tabelle 4: Gehalte an Tocopherolen in den Futterrationen in Versuch 2

	Kontrollfutter	Futter mit Fischölsulage
γ -Tocopherol ($\mu\text{mol/g}$)*	$0,023 \pm 0,002$	$0,007 \pm 0,001$
α -Tocopherol ($\mu\text{mol/g}$)*	$0,266 \pm 0,01$	$0,243 \pm 0,01$

* analysiert nach 4.5.2

Tabelle 5: Fettsäuremuster (g/100g Fettsäuren) der Futterrationen in Versuch 2

Fettsäuren	Kontrollfutter	Futter mit Fischölsulage
C 14:0	$0,92 \pm 0,10$	$7,36 \pm 0,43$
C 16:0	$32,5 \pm 0,67$	$24,9 \pm 1,92$
C 16:1 ω 9	$0,18 \pm 0,04$	$9,05 \pm 0,72$
C 18:0	$4,03 \pm 0,08$	$4,61 \pm 0,34$
C 18:1 ω 9	$30,6 \pm 1,00$	$13,3 \pm 0,51$
C 18:2 ω 6	$27,6 \pm 1,24$	$19,3 \pm 1,67$
C 18:3 ω 3	$1,71 \pm 0,58$	$1,81 \pm 0,09$
C 20:3 ω 3	n. n.	$0,05 \pm 0,04$
C 20:5 ω 3	n. n.	$7,13 \pm 0,32$
C 22:5 ω 3	$0,42 \pm 0,06$	$0,81 \pm 0,08$
C 22:6 ω 3	n. n.	$2,83 \pm 0,18$
Summe:		
SFA	$38,3 \pm 0,69$	$38,1 \pm 2,47$
MUFA	$32,1 \pm 1,12$	$28,8 \pm 1,08$
PUFA	$29,6 \pm 1,59$	$33,1 \pm 1,75$
ω 3-Fettsäuren	$2,01 \pm 0,60$	$12,6 \pm 0,60$
ω 6-Fettsäuren	$27,5 \pm 1,30$	$19,9 \pm 1,66$

* analysiert nach 4.5.3

Abkürzungen: n. n. nicht nachweisbar (unter der Nachweisgrenze von 0,01 g/100g FS)

4.3 Probengewinnung

Die Probenentnahme erfolgte durch Mitarbeiter der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Im ersten Versuch wurden Proben zu zwei Zeitpunkten der Laktation gewonnen. Zur Biopsieentnahme wurden die Sauen mit einer Mischung von 20 mg Ketamin (Ursotamin[®], Serumwerke Bernburg AG, Deutschland) und 2 mg Azaperon (Stresnil[®], Janssen, Neuss, Deutschland, Deutschland) pro kg Körpergewicht (KG) nach intramuskulärer Applikation narkotisiert und die Narkose mit 2,4 mg/kg KG Thiopental (Thiopental Inresa 0,5 g, Inresa Arzneimittel GmbH, Deutschland) aufrechterhalten. Die Biopsieentnahmen der Leber erfolgte an Tag 20 anhand der Vorgaben von Washburn *et al.* (2005). Die Sauen wurden in linker Seitenlage gebracht und die Hautbereiche, die für den Zugang zur Biopsie benötigt wurden, geschoren. Mit Ethanol (70 %) und Iodlösung wurden die vorbereiteten Stellen gereinigt und desinfiziert. Die Durchführung der Biopsieentnahme geschah unter Ultraschallkontrolle. Im Hautbereich 8 cm ventral des Ende der 10. Rippe, auf Höhe der ersten Zitze, wurde mit einer Skalpellklinge eine Stichinzision durchgeführt und eine Biopsienadel (16 gauge, 1,65 mm Durchmesser, 160 mm Länge) in Zusammenhang mit einem Histocore[®] System (BIP Biomed. Instrumente & Produkte GmbH, Deutschland) zur Entnahme verwendet. Zur Lokalanästhesie im Bereich der Stichinzisionen wurde 1 ml Lidocain (2 %, BelaPharm, Vechta, Deutschland) eingesetzt. Muskelbiopsien des *M. Longissimus dorsi* und Fettgewebeproben im Bereich des Rückenspecks wurden an Tag 10 und 20 der Laktation mit einem Spirotom (8 gauge, 200 mm Länge/ SR0820HO1010002) der Fa. Medinvents (Hasselt, Belgien) auf Höhe der letzten Rippe, handbreit lateral der Medianen entnommen. Die Hautwunden wurden im Anschluss mit Einzelheften aus synthetischem, resorbierbarem Nahtmaterial der Stärke USP 1-0 verschlossen. Gewebeproben wurden direkt nach der Gewinnung kryokonserviert und bei -80 °C gelagert.

Die Probenentnahme des zweiten Versuches fand ausschließlich am 20. Tag der Laktation statt. Die Sauen wurden entsprechend Versuch 1 narkotisiert und die Leber-, Muskel- und Fettgewebsbiopsien wie oben beschrieben entnommen. Blutproben wurden nach dreistündiger Nahrungskarenz im Bereich der *Vena jugularis* in heparinisierten Blutentnahmesystemen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) entnommen und anschließend das Plasma mittels Zentrifugation (1100 × g, 10 min, 4°C) gewonnen. Das Plasma wurde bei -80 °C aufbewahrt.

Hautwunden wurden im Anschluss mit Einzelheften aus synthetischem, resorbierbarem Nahtmaterial der Stärke USP 1-0 verschlossen.

Nach intravenöser Injektion von 20 I.E. Oxytocin (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) konnte im zweiten Versuch durch manuelles Abmelken Milchproben gewonnen werden. Dafür wurden die laktierenden Zitzen des Gesäuges gesäubert, desinfiziert und mit behandschuhter Hand ausmassiert, um eine repräsentative Poolprobe von ca. 100 ml zu gewinnen. Anschließend wurde die Milch mit Glaswolle filtriert, unter Zusatz von Natriumazid konserviert und bei -80 °C gelagert. Gewebeproben wurden ebenfalls direkt nach der Gewinnung kryokonserviert und bei -80 °C gelagert.

4.4 Material

Folgende Reagenzien wurden bei den durchgeführten Analysen verwendet. Verweise zu diesen Tabellen sind bei den jeweiligen Analysemethoden angegeben.

Tabelle 6: Reagenzien zur Bestimmung des Rohfettgehaltes

HCl (4N)	Stockmeier Chemie Dillenburg GmbH (Dillenburg, Deutschland)
n-Hexan Rotisolv	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 7: Reagenzien zur Bestimmung des Rohproteingehaltes

Katalysator (Kjeltabs CX) K ₂ SO ₄ , CuSO ₄ *5H ₂ O	Thompson & Capper LDT (UK)
Kongorot	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
konzentrierte Schwefelsäure, technisch rein	Stockmeier Chemie Dillenburg GmbH (Dillenburg, Deutschland)
Mischindikator	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Natronlauge (40%) aus Natrimhydroxid	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Oxalsäure	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 8: Reagenzien zur Bestimmung des Laktosegehaltes

Test-Combination Lactose/D-Glucose	R-Biopharm AG (Darmstadt, Deutschland)
------------------------------------	--

Tabelle 9: Reagenzien zur Bestimmung der Vitamin E- und Vitamin A-Konzentration

BHT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Ethanol 1 % MEK vergällt	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
H ₂ O, bi.dest	HPLC-Grade, 0,02 µm
Methanol HPLC-Grade	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
NaOH	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
n-Hexan Rotisolvl HPLC	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Pyrogallol 1 %ig in Lösung	Merck Millipore, (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 10: Reagenzien zur Bestimmung des Fettsäuremusters

Isopropanol HPLC (Chromanorm for HPLC)	VWR Prolabo® (Darmstadt, Deutschland)
n-Hexan Rotisolvl HPLC	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
TMSH, 0,2 M in MeOH	Macherey-Nagel (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 11: Reagenzien zur Bestimmung des Gehalts an Carnitin und dessen Vorstufen

Acetyl-Carnitin Einzelstandard	LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA)
Acetyl-D3-L-Carnitine-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
BB-HCL Einzelstandard	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Carnitine-Methyl-D3 HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
L-Carnitin Einzelstandard	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Methanol (HPLC-Grade)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
TML-HCL Einzelstandard	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

Tabelle 12: Reagenzien zur Bestimmung der freien Fettsäuren

NEFA Standard	Wako Chemicals GmbH (Neuss, Deutschland)
NEFA-HR(2) R1 Set	
Farbreagenz A, Lösung A	Wako Chemicals GmbH (Neuss, Deutschland)
NEFA-HR(2) R2 Set	
Farbreagenz B, Lösung B	Wako Chemicals GmbH (Neuss, Deutschland)

Tabelle 13: Reagenzien zur Bestimmung der Enzymaktivität von Glutathionperoxidase

Cu H ₂ O ₂ (Cumolhydroperoxyd, 80 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Glutathion reduziert, mind. 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Glutathionreduktase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
K ₂ HPO ₄	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
KH ₂ PO ₄ > 99 %	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NADPH	GERBU Biotechnik GmbH (Heidelberg, Deutschland)
NaN ₃	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 14: Reagenzien der Genexpressionsanalyse

5-fach Green GoTaq® Flexi Buffer	Promega (Madison, USA)
5-fach Puffer	Fermentas GmbH (Schwerte, Deutschland)
Bromphenolblau	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Chloroform	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
DEPC (Verwendet als DEPC-H ₂ O)	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
dNTPs (DNA Polymerisation Mix 10 nM each dNTP)	GeneCraft (Köln, Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Ethanol	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium (Hayward, CA, USA)
GeneRuler™ 100 bp	Fermentas GmbH (Schwerte, Deutschland)
Glycerol	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
KAPA™SYBR® FAST QPCR	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
konzentrierte Essigsäure	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumacetat	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
N-Morpholino-propansulfonsäure (Mops)	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Oligo-dT-Primer	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)
peqGOLD Universal Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Primer	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)
RevertAid™ Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Fermentas GmbH (Schwerte, Deutschland)
Tris	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
TRIzol ® Reagent	Invitrogen GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 15: Verwendete Puffer und Lösungen

DEPC-H ₂ O	0,1% DEPC in Reinstwasser, für 24 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, autoklaviert
50 x TAE-Puffer	242 g Tris, 57,1 ml konz. Essigsäure, 100 ml EDTA (0,5 M) aufgefüllt auf 1 Liter mit Reinstwasser
1 x TAE-Puffer	40 ml 50 x TAE-Puffer mit 1960 ml Reinstwasser aufgefüllt
5 x RNA-Gelladepuffer	2 mg Bromphenolblau, 8 µl 5 mM EDTA (pH 8), 72 µl Formaldehyd (37 %), 200µl Glycerol, 310 µl Formamid, 400 µl Formaldehyd-Gelpuffer
10 x Formaldehy-Gelpuffer	200 mM Mops, 50 mM Natriumacetat x 3 H ₂ O, 10 mM EDTA; End-pH des Puffer pH 7
Kaliumphosphat-Puffer	500 ml mit pH 7 bestehend aus KH ₂ PO ₄ (0,02 mol/l), K ₂ HPO ₄ (0,034 mol/l), EDTA (0,00015 mol/l) und NaN ₃ (1,12 mol/l)

4.5 Methoden

4.5.1 Charakterisierung der Milch

Die Bestimmung der Milchproben beruhte auf der Grundlage der Weender-Analyse, entwickelt nach Henneberg und Strohmann (1860, 1864). Die Methoden zur Rohprotein- und Rohfettbestimmung wurden nach dem VDLUFA (Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten)-Methodenbuch Band III (Bassler, 1976) vorgenommen und gegebenenfalls modifiziert. Die Laktosebestimmung wurde anhand eines Enzymtestsatz der Fa. R-Biopharm (Testsatz 10986119035) durchgeführt.

4.5.1.1 Rohfett (Amtliche Methode, 5.1.1 Verfahren B)

Die Methode basiert auf der Extraktion des enthaltenen Rohfettes mittels des Lösungsmittels n-Hexan. In der vorliegenden Arbeit wurde der Rohfettgehalt der Sauenmilch und der verwendeten Diät analysiert. Verwendete Reagenzien sind in Tabelle 6 gelistet.

Folgende Modifikationen wurden vorgenommen:

- Hexan anstelle des Petrolether
- 4 N HCl anstelle einer 3 N HCl
- keine Verwendung von Kieselgur
- Warmextraktion anstatt Kaltextraktion nach Soxhlet

Zum Säureaufschluss der Probe wurde das Aufschlussgerät *Büchi Digestion-Unit*, zur Warmextraktion wurde das Extraktionssystem B-811 (Büchi) verwendet.

4.5.1.2 Rohprotein (Amtliche Methode, 4.1.1 KJELDAHL-Aufschluss)

Der Proteingehalt der Milchproben wurde mittels Stickstoff-Bestimmung nach Kjeldahl analysiert. Diese Methode beruht auf der Bindung der organischen Stickstoffverbindungen als Ammoniumsulfat nach Erhitzung in konzentrierter Schwefelsäure. Nach Zugabe von Natronlauge wird der Stickstoff in Form von Ammoniak frei und kann nach Destillation in Schwefelsäure wieder gebunden werden. Die überschüssige Säure kann titrimetrisch bestimmt und auf den Stickstoffanteil rückgeschlossen werden.

Folgende Modifikationen wurden vorgenommen:

- Katalysator: pro 1 g Probe wurde ein halbes Kjeltab (2,5 g Kaliumsulfat, 0,25 g Kupfersulfat-5H₂O) eingesetzt, anstelle von 15 g Kaliumsulfat und 0,9-1,2 g Kupfersulfat-5H₂O pro 1 g Probe
- 20 ml anstelle von 25 ml Schwefelsäure
- zusätzlich Verwendung von Bimssteinen und Zinkkörnern

Hierbei wurde die B-323 Destillation Unit (Büchi) verwendet. Verwendete Reagenzien zeigt Tabelle 7.

4. 5. 1. 3 Laktose

Zur Analyse der Laktosekonzentration wurde der Enzymtestsatz 'Lactose/D-Glucose' (10986119035) der Fa. R-Biopharm verwendet. Dieser beruht auf dem Prinzip der enzymatischen Umsetzung von Laktose zu D-Gluconat-6-phosphat und NADPH + H⁺, wobei NADPH + H⁺ photometrisch bei 365 nm erfasst wird. Die Laktosekonzentration errechnet sich im Anschluss aus der Konzentrationsmessung mit und ohne Enzymeinsatz. Verwendete Reagenzien sind in Tabelle 8 zu finden.

4. 5. 1. 3. 1 Probenaufbereitung und Messung

Die Reagenzien wurden anhand der Vorgaben des Herstellers vorbereitet. An der Ausführung des Testsatzes wurden folgende Modifikationen vorgenommen:

- 50 µl Probenvolumen mit einer Verdünnung von 1:100
- es wurde nur Hälfte der angegebenen Volumina verwendet (Testvolumen: 1,635)

Die Extinktionen wurde bei 365 nm in einem Cary[®]50 Bio-Spektralphotometer (Varian) nach Testvorschrift gemessen. Hierzu wurde die Software Cary Win UV-Simple Reads (Version 3.00) verwendet.

4. 5. 1. 3. 2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration wurde nach den Vorgaben des Herstellers berechnet.

4. 5. 1. 4 Energiegehalt der Milch

Der Energiegehalt der Milch wurde anhand der Hauptkomponenten Fett, Protein und Laktose ermittelt. Hierbei wurden die analysierten Konzentrationen der Einzelkomponenten mit den entsprechenden Energiegehalten von Fett (39 MJ/kg), Protein (24 MJ/kg) und Laktose (17 MJ/kg) verrechnet (Kirchgeßner, 2008).

4. 5. 2 Vitamin A- und Vitamin E-Konzentration in Milch und Futter

Die Vitamin A- und E-Konzentration wurde durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) nach einer modifizierten Methode von Catignani und Bieri (1983) und Balz *et al.* (1993) gemessen. Der Aufbereitung liegt die Verseifung der Fette mit dem darin gebundenen fettlöslichen Vitamin A und E und der anschließend Extraktion der Vitamine mittels Hexan zugrunde. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 9 zu finden.

4. 5. 2. 1 Probenaufbereitung

4. 5. 2. 1. 1 Milch

Jeweils 0,5 ml der Milch wurden mit 2 ml einer Ethanol-Pyrogallol-Lösung versetzt. Anschließend wurden 300 µl gesättigte Natronlauge hinzugefügt. Dieses Gemisch unter Stickstoffatmosphäre bei 70 °C für 30 min der Verseifung unterzogen. Im Anschluss wurden 2 ml Hexan und die gleiche Menge zweifach destilliertes Wasser untergemischt, kräftig vermischt und zur Phasentrennung bei 3000 U/min bei 10 °C für 5 min zentrifugiert. 1200 µl der oberen Hexanphase wurden unter Stickstoffbegasung bei 37°C zur Trocknung eingedampft. Der Rückstand wurde mit 0,8 ml Methanol-BHT-Gemischs (0,05 % BHT v/v) gelöst und in HPLC-Microvials zur Analyse mittels HPLC überführt.

4. 5. 2. 1. 2 Futter

Mit den Futterproben wurde entsprechend verfahren. Unterschiede zu den Milchproben gab es nur im Bezug auf die Menge des Probenmaterials und des Volumen der Methanol-BHT-Lösung. Hier wurden 0,2 g der Probe eingesetzt und 1 ml Hexanphase verwendet. Ansonsten entsprach es dem Vorgang der Aufbereitung von Sauenmilch.

4. 5. 2. 2 HPLC

Verwendete Geräte zur Analyse zeigt Tabelle 16.

Tabelle 16: Verwendete Geräte der Fa. Hitachi/VWR (Darmstadt, Deutschland) zur Analyse der Konzentrationen an Vitamin A und E via HPLC

Pumpe	L-7100 (LaChrom)
Säulenofen	Jet Stream Plus
Autosampler	L-7200 (LaChrom)
Detektor	Fluoreszenz Detektor L-7480 (LaChrom)
Säule	LiChrosphere® RP1 18; 125 mm, 5µm, 4,6 mm
Vorsäule	LiChrosphere® RP18 4-4, 5µm

Da der Fluoreszenzdetektor für die Bestimmung von Vitamin A und E verwendet wurde, musste eine Wellenlängenschaltung vorgenommen werden. Die entsprechenden Einstellungen zeigt Tabelle 17.

Tabelle 17: Einstellungen des FL-Detektors mit vorgenommener Wellenlängenschaltung und Retentionszeiten zur Ermittlung der Konzentrationen an Vitamin A und E

	Substanz	Retentionszeiten
bis 2,4 min EM 475 nm, EX 325nm	Retinol	1,7 min
ab 2,5 min EM 325 nm, EX 295nm	γ-Tocopherol	4,2 min
	α-Tocopherol	5,0 min

Abkürzungen: EM Emissionswellenlänge; EX Anregungswellenlänge (Excitation wavelengh)

Die Einstellungen und Auswertung wurden über den EZChrom Elite Version 3.3.1 vorgenommen.

Verwendet wurde ein Injektionsvolumen von 50 µl unter einem Druck von 88 bar und einer Temperatur des Säulenofens von 40 °C. Als Fließmittel wurde ein Methanol-Wassergemisch in Verhältnis von 95:5 (v/v) eingesetzt und eine Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min vorgegeben.

4. 5. 2. 3 Kalibration

Zu Beginn jeden Laufes wurde eine Kalibrierung mittels vier Verdünnungsstufen eines Standard-Mixes durchgeführt, der sowohl eine bekannte Menge an Vitamin A als auch und Vitamin E (α - und γ -Tocopherol) enthielt. Die abgedeckt Bereiche der Analyse zeigt Tabelle 18.

Tabelle 18: Kalibrationsbereiche zur Analyse der Konzentrationen an Vitamin A und E mittels HPLC

Retinol	0,026 - 0,627 µg/ml
γ -Tocopherol	0,009 - 0,066 µg/ml
α -Tocopherol	0,054 - 1,296 µg/ml

4. 5. 2. 4 Konzentrationsbestimmung

Anhand der Retentionszeiten konnten die erhaltenen Chromatogramme der zugehörigen Substanz zugeordnet werden. Abbildung 1 zeigt zur Veranschaulichung zum einen das Chromatogramm eines Kalibrationsstandards, zum anderen das einer Testprobe aus der Kontrollgruppe.

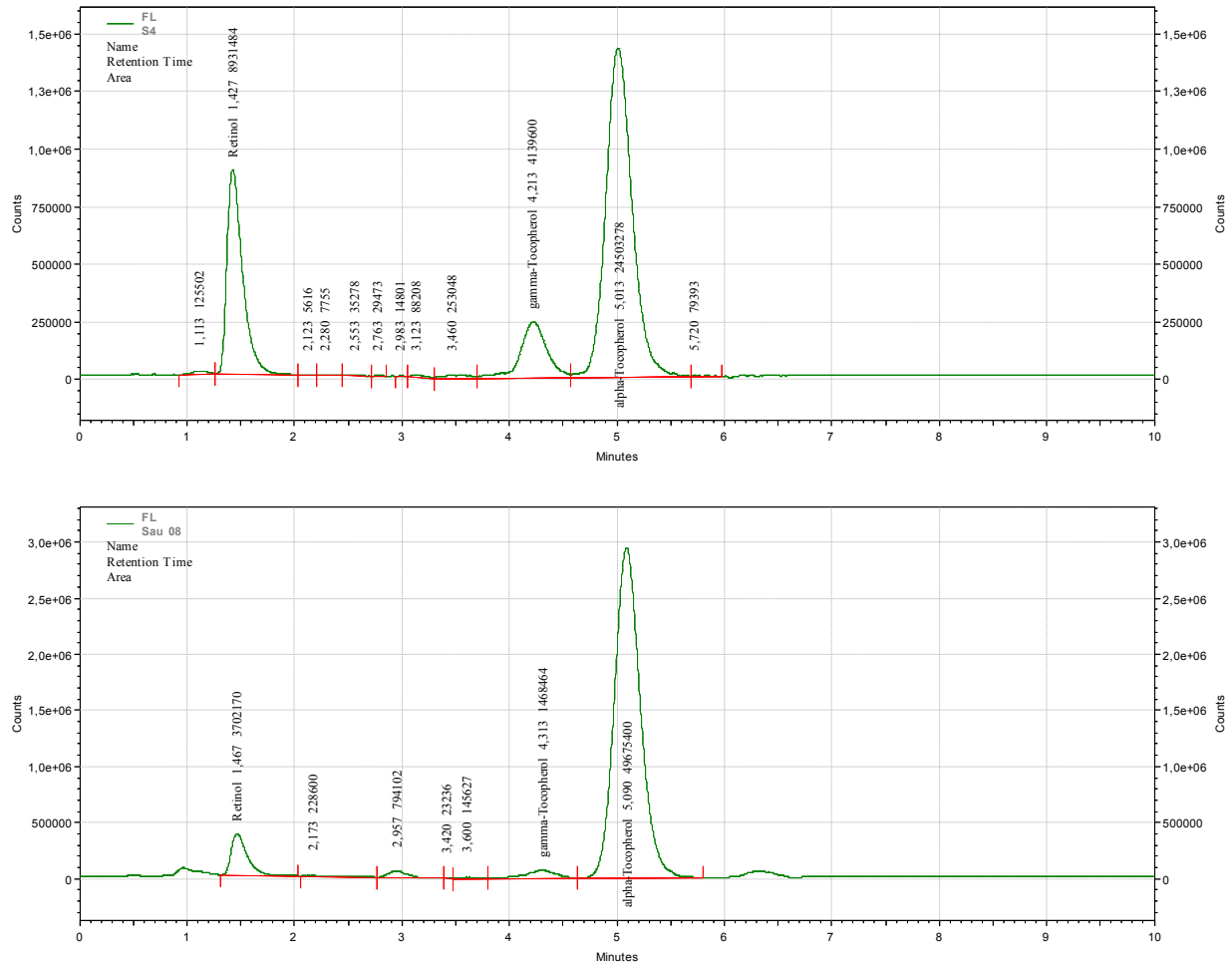


Abbildung 6: Chromatogramme der HPLC zur Ermittlung der Vitamin E- und Vitamin A-Konzentrationen. Die obere Abbildung zeigt das Chromatogramm des Standards. Der erste Peak (von links gezählt) entspricht Retinol, der zweite γ -Tocopherol und der dritte Peak zeigt α -Tocopherol. An den Peaks sind der entsprechende Name, die Retentionszeit und die zugehörige Fläche unter der Kurve angegeben. Weitere minimale Peaks sind zu vernachlässigen. Sie sind meist Teil des Grundrauschens. Die untere Abbildung zeigt das Chromatogramm einer Testprobe (hier der Kontrollgruppe). Anhand der Retentionszeiten können die Peaks der jeweiligen Substanz zugeordnet werden.

Mit Hilfe der Software EZChrom Elite (Version 3.3.1) konnten die Peakflächen ermittelt werden. Die Quantifizierung erfolgte anhand linearer Regression über die Peakflächen unter Einbeziehung des Volumens und Verdünnung.

4. 5. 3 Bestimmung des Fettsäuremusters in Milch und Futter

Zur Bestimmung des Fettsäuremusters wurden die in den Proben enthaltenen Fettsäuren mittels eines Hexan-Isopropanolgemisches extrahiert (Hara und Radin, 1978) und in Fettsäuremethylester (FAMES) überführt (Butte, 1983). Anschließend konnten die Verteilung

der Fettsäuren gaschromatographisch erfasst werden. Verwendete Reagenzien sind in Tabelle 10 ersichtlich.

4. 5. 3. 1 Probenaufbereitung

4. 5. 3. 1. 1 Milch

250 µl Probenmaterial wurden mit 2 ml eines Hexan/Isopropanol-Gemisches (3:2, v/v) versetzt, mit gasförmigem Stickstoff bedeckt und über Nacht in einer Schüttelapparatur (GFL 3015) bei Raumtemperatur 18 Stunden im Dunkeln horizontal geschwenkt. Im Anschluss wurde 1 ml destilliertes Wasser hinzugefügt und die Mischung kräftig gewhirlt, um eine gleichmäßige Verteilung aller Bestandteile zu erreichen. Anschließend wurden die Proben zur Phasentrennung für 5 min bei 10 °C und 3000 U/min zentrifugiert (Varifuge K von Herarus Christ GmbH, Osterode). Der Überstand wurde vollständig in ein GC-Gläschen überführt und in einem Evaporator[®] (Liebisch) bei 37 °C unter Stickstoff eingedampft. Zur Methylierung der Fettsäuren wurden 75 µl TMSH hinzugegeben. Die Proben konnten im Anschluss im Gaschromatographen analysiert werden.

4. 5. 3. 1. 2 Futter

Bei den Futterproben wurden 250 mg eingewogen, mit 4 ml Hexan/Isopropanolgemisch (3:2, v/v) vermischt und analog der Milchproben der Extraktion unterzogen. Nach Zentrifugation unter gleichen Bedingungen konnte von dem Überstand 250 µl abgenommen und zum Eindampfen unter Stickstoffatmosphäre überführt werden. Nach dem Eindampfen wurden 100 µl TMSH hinzugefügt. Die Inkubationsbedingungen entsprachen den Milchproben. Zwischen 75 und 100 µl wurden aus den Gläschen gewonnen und zur Gaschromatographie verwendet.

4. 5. 3. 2 Gaschromatographie

Verwendet Geräte und Einstellungen der Analyse sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Verwendete Geräte und Einstellungen zur Analyse des Fettsäuremusters via Gaschromatographie

Chromatograph	PE Clarus 580 (PerkinElmer)		
Säule	FFAP Optima Plus (Macherey-Nagel) (Säulenummer: 22678-8), 50 m, 0,25 mm ID, 0,2 µm df		
Einstellungen	Injektor/ Detektor (FID)		260 °C
	Trärgas	He	Vordruck 360 kPa, 25,4 cm/sec
	Brenngase	H ₂	45 cm ³
		Synthetische Luft	450 cm ³
	Injektionsvolumen	1µl	
	Injektionsart	5 µl Spritze im Autosampler	
	Injektionssplit	1:20	
	Inlay	4mm Quarzinlay mit Glaswatte	
Temperaturprogramm :			
1. 140 °C für 2 min			
2. mit 5 °C/min auf 200 °C			
3. 15 min auf 200 °C			
4. mit 2 °C/min auf 240 °C			
5. 25 min auf 240 °C			

Die Einstellungen und Auswertung wurden über den EZChrom Elite (Version 3.3.1) vorgenommen.

4. 5. 3. 3 Kalibration

Die Kalibration wurde mit der Flächenberechnung des 37 Komponenten *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME)-Mix Standards (Supelco, 18919) der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) durchgeführt. Einzelstandards von Fettsäure-Methylester, die nicht im FAME-Standard enthalten waren, wurden ebenfalls von der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH

(Deutschland) bezogen. Hierzu gehörten cis-11-Octadecen-Methylester (C 18:1 ω 7, Supelco, 46904) und all-cis-7,10,13,16,19-Docosapentaen-Methylester (C 22:5, Sigma, 17269).

4. 5. 3. 4 Normprozentbestimmung

Für jeden Lauf wurden die Chromatogramme aufgrund ihrer spezifischen Retentionszeiten den zugehörigen Fettsäuren der Standardchromatogramme zugeordnet und eine Flächenberechnung unter Zuhilfenahme des Programms EZChrom Elite (Version 3.3.1) durchgeführt. Ein Chromatogramm des FAME-Standards ist zur Veranschaulichung in Abbildung 2 abgebildet.

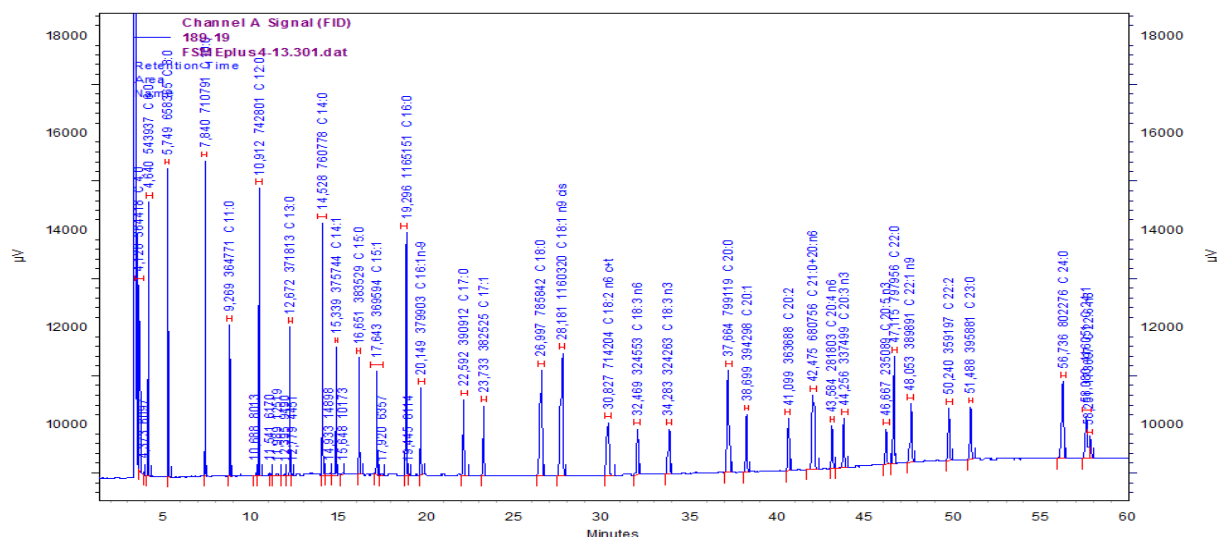


Abbildung 7: Chromatogramm des FAME-Standards. Jeder Peak kann anhand seiner Retentionszeit zugeordnet werden. An den Peaks ist die entsprechende Retentionszeit, die zugehörige Fläche unter der Kurve und der entsprechende Name angegeben. Weitere minimale Peaks zwischen den Peaks des FAME-Standards sind zu vernachlässigen. Sie sind meist Teil des Grundrauschens.

Die Berechnung der Fettsäureverteilung erfolgte als relativer Anteil der Peakfläche an der Gesamtpeakfläche. Die Fettsäuren wurden als Normprozente (g/100g) angegeben.

4. 5. 4 Bestimmung von L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, γ -Butyrobetain und Trimethyllysin im Plasma und Milch

Die Konzentration von Carnitin und dessen Vorstufen wurde mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) kombiniert mit einem Tandem-

Massenspektrometers (MS/MS) nach einer modifizierten Methode von Hirche (Hirche *et al.*, 2009) ermittelt. Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 11 aufgeführt.

4. 5. 4. 1 Probenaufbereitung

4. 5. 4. 1. 1 Milch

100 µl der Milch wurde mit 400 µl eines Methanol-Wassergemischs (1:2 v/v) vermischt. Nach kräftigem Mischen wurden die Proben im Thermoshaker T S1 (Biometra) bei 50 °C und 150 U/min für 30 min inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden sie bei 10°C bei 20.000 g zentrifugiert. 40 µl des Überstandes wurden mit 200 µl Methanol/interner Standard (Carnitine-Methyl-D3-HCl 2,54 µM, Acetyl-D3-L-Carnitine-HCl 0,83 µM) versetzt und Raumtemperatur 10 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zentrifugation bei oben genannten Bedingungen. Der Überstand wurde in Microvials überführt und der Analyse mittels MS-HPLC unterzogen.

4. 5. 4. 1. 2 Plasma

Das Plasma wurde bei 600 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. 40 µl Plasma wurde mit 200 µl Methanol/internem Standard vermischt und für 5 min zur besseren Ausfällung der Proteine auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde das Gemisch bei 20000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und 75 µl des Überstandes für die Analyse im Autosampler in Mikrovials überführt.

4. 5. 4. 2 Messung mittels HPLC-MS/MS

Verwendete Geräte zur Analyse zeigt Tabelle 20.

Tabelle 20: Geräte zur Analyse der Konzentrationen an L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, Trimethyllysin und γ -Butyrobetain mittels HPLC-MS/MS

Säule	Kromasil 100 Si; 5 μ m, 125 mm x 2 mm (CS-Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland)
Vorsäule	Silica 4 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
HPLC-System (Fa. Hitachi/VWR, Darmstadt, Deutschland)	
Pumpe	L-2160U (LaChrom) binäres Pumpsystem L-6000 HPLC-Pumpe
Säulenofen	L-2300 Säulenthermostat
Autosampler	L-2200U (LaChrom)
Detektor	MS-System (Fa. ABSciex, Darmstadt, Deutschland) MS/MS 3200 Qtrap

Die Auswertung erfolgte anhand der Software Analyst 1.5.1.

4. 5. 4. 3 Kalibration

Die Kalibrationsstandards, bestehend aus L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, Trimethyllysin und γ -Butyrobetain, wurden entsprechend der Proben ebenfalls mit Internem Standard versehen und aufgearbeitet. Die abgedeckten Kalibrationsbereiche zeigt Tabelle 21:

Tabelle 21: Kalibrationsbereiche zur Analyse der Konzentrationen an L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, Trimethyllysin und γ -Butyrobetain mittels HPLC-MS/MS

L-Carnitin	1,52 - 24,3 μ M
Acetyl-Carnitin	0,30 - 4,84 μ M
Trimethyllysin	0,28 - 4,45 μ M
γ -Butyrobetain	0,35 - 5,64 μ M

4. 5. 4. 4 Konzentrationsbestimmung

Die Substanzen wurden anhand der Mutter/Tochter-Fragmente identifiziert und die Konzentrationen mittels Interner Standard-Korrektur und linearer Regression über deren Peakflächen unter Einbeziehung des Volumens bzw. der Einwaage berechnet.

4. 5. 5 Bestimmung der Menge an freien Fettsäuren im Plasma

Zur Analyse der freien Fettsäurenkonzentration wurde das kommerzielle Testkit NEFA-HR(2) der Fa. Wako Chemicals GmbH (Neuss, Deutschland) genutzt und teilweise modifiziert nach den Vorgaben des Herstellers angewendet.

Der Nachweis basiert auf der enzymatischen Umsetzung der freien unveresterten Fettsäuren durch das Enzym Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA, AMP und Phosphorsäure. In weiteren Schritten unter Einwirkung von Acyl-CoA-Oxidase und Peroxidase wird durch oxidative Bindung eine blau-violette Färbung erzeugt. Diese kann photometrisch erfasst werden (Aufenanger und Kattermann, 1995). Verwendete Reagenzien sind in Tabelle 12 zu finden.

4. 5. 5. 1 Probenaufbereitung und Messung

Zu Beginn der Aufbereitung wurden die Reagenzien des Testkits gemäß den Angaben des Herstellers hergestellt. Folgende Modifikationen wurden vorgenommen:

30 µl unverdünntes Plasma wurden mit 250 µl des Testreagenz A vermischt und bei 37°C für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Extinktion bei 546 nm in einem Cary® 50 Bio-Spektralphotometer (Varian) gemessen (Probenleerwert). Daraufhin wurden 500µl des Testreagenz B zugegeben, 10 min Inkubationszeit abgewartet und erneut die Extinktion gemessen. Hierzu wurde die Software Cary Win UV-Kinetics (Version 3.00) verwendet.

4. 5. 5. 2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in Relation zum zugehörigen NEFA-Standard mit einer Konzentration von 1 mmol/l anhand der Vorgaben des Herstellers.

4. 5. 6 Bestimmung der Enzymaktivität der Glutathion-Peroxidase (GPX) im Plasma

Die Enzymaktivität der GPX wurde nach der Methode von Lawrence und Burk (1976) gemessen.

Grundlage dieser Methode ist die enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Bei dieser Reaktion wird reduziertes Glutathion durch die Glutathionperoxidase zu Glutathiondisulfid oxidiert und dieses durch die Glutathionreduktase wieder zur ursprünglichen Form unter Verbrauch von NADPH reduziert, was durch einen Extinktionsabfall begleitet wird. Dieser kann photometrisch erfasst werden. Verwendete Reagenzien sind der Tabelle 13 zu entnehmen. Für die Analyse wurde der Kaliumphosphat-Puffer aus Tabelle 15 verwendet.

Für den Reaktionsansatz wurde folgender Reaktionsmix benötigt:

10 ml bestehend aus:

- reduziertem Glutathion (1 mmol/l)
- NADPH (1 mmol/l)
- Glutathion-Reduktase (1 U/l; 39,06 µl)
- Kaliumphosphat-Puffer

Zur Messung wurden 50 µl Plasma mit 900 µl Reaktionsmix vermischt und unter Zugabe von 50 µl CuH₂O₂ die Reaktion gestartet. Bei einer Wellenlänge von 340 nm wurde über einen Zeitraum von exakt 2 min die Extinktionen mit einem Cary®50 Bio-Spektralphotometer (Varian) erfasst. Hierzu wurde die Software Cary Win UV-Kinetics (Version 3.00) verwendet.

Unter Verwendung der folgenden Formel konnte die Enzymaktivität der Glutathion-Peroxidase in Units pro Liter berechnet werden:

$$A(U/l) = \frac{V \times \Delta E/\min}{\epsilon \times d \times v} \times \text{Verdünnung}$$

V = Gesamtvolumen des Testansatz, ΔE = Extinktionsänderung abzüglich des Blindwertes, ε = Extinktionskoeffizient von NADPH + H⁺ bei 340 nm, d = Schichtdicke der Küvette, v = Volumen der Probe. Der Extinktionskoeffizient ε von NADPH + H⁺ bei 340 nm beträgt 0,00622 L/µmol*cm.

4. 5. 7 Genexpressionsanalyse

Durch die *quantitative real time polymerase chain reaction* (kurz qPCR) kann ein gewünschter Teil der DNA anhand spezifischer Primer amplifiziert (Mullis *et al.*, 1992) und das Produkt schon während der Analyse quantitativ gemessen werden. Dies beruht auf der Anlagerung des fluoreszierenden Farbstoffs *Sybr Green* an die DNA-Helix. Die Fluoreszenz ist proportional zur Menge des amplifizierten Produkts.

Hierzu benötigt man komplementäre DNA, so genannte cDNA, die durch reverse Transkription über isolierte RNA aus den Gewebeproben hergestellt wird. Die Produkte der qPCR werden durch Gelelektrophorese auf ihre Größe mittels Vergleich mit einer DNA-Leiter bekannter Größe untersucht, um die Bildung des gewünschten Produktes zu überprüfen.

Verwendete Reagenzien zeigt Tabelle 14. Die verwendeten Puffer und Lösungen mit ihrer Zusammensetzung sind in Tabelle 15 zu finden.

4. 5. 7. 1 Geräte

Die verwendeten Geräte zur Analyse zeigt Tabelle 22.

Tabelle 22: Verwendete Geräte zur Genexpressionsanalyse

TissueLyser	Qiagen GmbH, Deutschland
HERAEUS Fresco 21 Centrifuge	Thermo Electron LED GmbH, Deutschland
Thermoschüttler	Eppendorf AG, Deutschland
Plattenreader TECAN infinite M200	TECAN Austria GmbH, Österreich
NanoQuant plate™	TECAN Austria GmbH, Österreich
Thermocycler TProfessional BASIC	Biometra GmbH, Deutschland
Rotorgene Q	Qiagen GmbH, Deutschland

4. 5. 7. 2 Isolation der RNA

Zur RNA-Gewinnung aus dem Probengewebe wurde TRIzol® Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Hierfür wurde ca. 15 mg

Lebergewebe und 30 mg Muskulatur mit 1 ml TRIzol[®] versetzt. Zur Homogenisation wurde ein Tissue Lyser (Qiagen GmbH, Deutschland) genutzt. Das Lebergewebe wurde bei 15 Hz für 4 min, die Muskulatur bei 17,5 Hz für 3 min homogenisiert. Für die RNA-Isolation der Fettgewebs- und Milchdrüsenbiopsien wurde das Isolationskit *RNEasy Lipid Tissue Mini Kit* der Fa. Qiagen nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Bezüglich des Fettgewebes wurde eine Einwaage von 100 mg vorgenommen, von den Milchdrüsenbiopsien wurden 45-55 mg verwendet.

Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben für etwa zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 15 min bei 4 °C mit 13.000 U/min zentrifugiert und die obere RNA-haltige Phase abgenommen. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol erfolgte erneut eine Inkubation für 10 min. Nach erneuter Zentrifugation für zehn Minuten bei gleichen Bedingungen wurde der Überstand restlos entfernt und es blieb ein Pellet zurück. Dieses wurde mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen und bei oben genannten Bedingungen für 5 min erneut zentrifugiert. Nach Trocknung konnte das isolierte RNA-haltige Pellet mittels DEPC-H₂O in Lösung gebracht werden. Hierfür wurde ein Thermoschüttler (Eppendorf AG, Deutschland) für 10 min bei 60 °C unter 900 U/min genutzt. Für die Leber wurden 75 µl, für die Muskulatur 50 µl DEPC-H₂O zum Lösen verwendet. Im Falle des Fett- und Milchdrüsengewebes wurden 30 µl bzw. 40 µl des *RNase-free water* des Isolationskits eingesetzt. Die RNA wurde bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

4. 5. 7. 3 Qualitätsbestimmung

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mit einem Tecan infinite M200-Spektrometer (TECAN Austria GmbH, Österreich) bestimmt. 2 µl jeder Probe wurde auf eine NanoQuant plate[™] gegeben und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm erfasst. Zuvor wurde gegenüber DEPC-H₂O geeicht. Unter Verwendung der Tecan i-control Software wurde die Konzentration bestimmt. Die Reinheit wurde anhand des Quotienten aus der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ermittelt und lag zwischen 1,8 und 2,0. Die Integrität der RNA wurde anhand eines 1 %igen Agarosegels auf das Vorhandensein der 18S- und 28S-Bande überprüft (siehe 1.5.7.6).

4. 5. 7. 4 cDNA-Synthese

Zur Herstellung von doppelsträngiger cDNA, aus einzelsträngiger RNA wird ein Mastermix benötigt. Dessen Zusammensetzung ist in Tabelle 23 zu finden.

Tabelle 23: Zusammensetzung des Mastermix zur cDNA-Synthese

	Volumen (µl) *
5fach Puffer	5
DEPC-H ₂ O	12,5
dNTP	1,25
Oligo-dT-Primer	1
Reverse Transkriptase	0,3

*Die angegebenen Volumina beziehen sich auf die Herstellung des Mastermixes für einen Reaktionsansatz

Die RNA jeder Probe wurde auf einheitliche Konzentration von 1,2 µg pro Syntheseansatz angepasst. Nach Herstellung des Mastermixes konnte jeder RNA-Probe die entsprechende Menge Mastermix bis zu einem Endvolumen von 25 µl zugegeben und im Thermocycler (Biometra) folgendes Temperatur-Zeit-Programm durchlaufen werden:

- reverse Transkription bei 42 °C für 1 h (Optimum des Enzyms)
- Abbruchsreaktion bei 72 °C für 10 min

Nach Abkühlung konnten die Proben mittels 50 µl DEPC-H₂O verdünnt und bei -20 °C gelagert werden, bis weiteren Analysen durchgeführt werden konnten.

4. 5. 7. 5 Real-Time-Polymerase chain reaction

Für die Real-Time-Polymerase chain reaction wurde ein Mastermix angesetzt. Dessen Zusammensetzung ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Zusammensetzung des Mastermixes für die q-PCR

	Volumen (µl)*
DEPC-H ₂ O	7,2
Primer vorwärts (10mM)	0,04
Primer rückwärts (10mM)	0,04
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix Universal	10,0

*Die angegebenen Volumina beziehen sich auf die Herstellung des Mastermixes für einen Reaktionsansatz

2 µl cDNA wurden mit 18 µl des Mastermixes versetzt, der für jedes Gen mit den dazugehörigen Primern neu angesetzt wurde. Die Primer wurden mit Hilfe der Softwares Primer3web (Version 4.0.0, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Massachusetts) und BLAST (NCBI, National Center for Biotechnology Information) (Ye *et al.*, 2012) entworfen und über Eurofins MWG Operon bezogen. Ihren Details sind in Tabelle 25 und 27 gelistet. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass Vorwärts- und Rückwärtsprimer, wenn möglich, intronüberspannend positioniert wurden und optimaler Weise eine Annealing-Temperatur von 60 °C aufwiesen. Für die PCR wurde ein Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Folgendes Temperatur-Zeitprogramm wurde durchlaufen:

- Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min
- Zyklus (zwischen 35 und 40 Wiederholungen):
- Denaturierungsphase bei 95 °C für 5 s
 - Anlagerungsphase bei Primer-spezifischer Temperatur (optimal: 60 °C) für 20 s
 - Amplifikationsphase bei 72 °C für 1 s
- Zuletzt:
- Schmelzkurvenanalyse von 50 °C auf 95 °C

Zur Kontrolle wurde bei jeder Messung zwei Ansätze ohne cDNA-Zusatz (NTC, Non-template-Control) der PCR unterzogen. Hier sollte sich kein Amplifikat bilden. Zur Ermittlung der relativen mRNA-Expression wurden als Messparameter der C_t-Werte (cycle threshold) bei 0,06 durch die Software Rotor-Gene Q (Version 2.0.2) ermittelt.

Zu Beginn der Analysen wurden sechs Referenzgene gemessen und mit Hilfe der Anwendung 'GeNorm' darunter die drei stabilsten Genexpressionsraten ermittelt (Tabelle 26). Angesichts dieser konnten von dem verwendeten Programm Normalisierungsfaktoren berechnet werden (Vandesompele *et al.*, 2002), die für die Berechnung der Expressionsrate der Zielgene herangezogen wurden. Hierbei wurden die C_t -Werte mittels der Methode von Livak und Schmittgen (2001) unter Verwendung der Formel $2^{-\Delta C_t}$ in relative Mengen transformiert, der größte Wert mit dem Wert '1' gleichgesetzt und die Ergebnisse mit den ermittelten Normalisierungsfaktoren korrigiert. Aus den hieraus sich ergebenden Werten wurden die Behandlungsgruppen mit der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Resultate wurden mit $MW \pm SD$ beschrieben.

Die *qPCR performance data* wurde mittels einer Verdünnungsreihe für alle verwendeten Primer bestimmt und gemäß den Angaben der MIQE-Guidelines (Bustin *et al.*, 2009) berechnet (Tabellen 25,27). Die Effizienz der Primer ergab sich aus $10^{(-1/\text{Slope})}-1$.

Tabelle 25: Referenzgene, Primereigenschaften für q-PCR

Gen anerkanntes Symbol	Primersequenz (5' → 3') -vorwärts- -rückwärts-	Produkt- größe (bp)	T _A	NCBI-GenBank	Slope	R ² *	E **
<i>ACTB</i>	GACATCCGCAAGGACCTCTA ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	205	60	XM_003124280.2	-3,76	1,000	0,84
<i>ATP5G1</i>	CAGTCACCTTGAGCCGGGCGA TAGCGCCCCGGTGGTTTGC	94	64	NM_001025218.2	-3,34	0,999	0,99
<i>GSR</i>	AGCGCGATGCCTACGTGAGC GGTACGCCGCCTGTGGCAAT	175	60	XM_003483635.2	-3,43	0,997	0,96
<i>RPS9</i>	GTCGCAAGACTTATGTGACC AGCTTGAAGACCTGGGTCTG	325	60	XM_005664825.1	-3,78	0,999	0,84
<i>SDHA</i>	CTACGCCCCCGTCGCAAAGG AGTTTGCCCCCAGGCGGTTG	380	64	DQ402993	-3,66	0,994	0,87
<i>SHAS2</i>	GAAAAGGCTAACCTACCCTG TGTTGGACAAGACCAGTTGG	218	60	NM_214053.1	-3,87	0,990	0,81

* Bestimmungskoeffizient der Eichkurve

** E = Effizienz. Die Effizienz wurde unter Verwendung der Formel $E=10^{(-1/\text{Slope})}-1$ ermittelt (Bustin *et al.*, 2009).
Abkürzungen: *ACTB* β-Actin; *ATP5G1* ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9); *T_A* Annealing-Temperatur; *bp* Basenpaare; *GSR* Gluthatione reductase; *RPS9* 40S ribosomal protein S9-like; *SDHA* Succinate dehydrogenase complex, subunit A; *SHAS2* Hyaluronan synthase 2.

Tabelle 26: Expressionsstabilitäten (M-Werte) der drei stabilsten Referenzgene in den verwendeten Geweben gemäß 'GeNorm'

Leber		Muskel	
Gen	M-Wert	Gen	M-Wert
ATP5G1	0,033	RPS9	0,036
ACTB	0,034	GSR	0,038
RPS9	0,034	ACTB	0,040

Abkürzungen: *ACTB* β -Actin; *ATP5G1* ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9); *GSR* Glutathione reductase; *RPS9* 40S ribosomal protein S9-like.

Tabelle 27: Zielgene, Primereigenschaften für qPCR

Gen anerkanntes Symbol	Primersequenz (5' → 3') -vorwärts- -rückwärts-	Produkt -größe (bp)	T _A	NCBI-GenBank	Slope	R ² *	E **
<i>ACACA</i>	AACAAGGACCTGGTGGAGTG CAGGAGGCTCTTCCTACGTG	256	60	NM_001114269.1	-3,13	1,000	1,09
<i>ACOX1</i>	CTCGCAGACCCAGATGAAAT TCCAAGCCTCGAAGATGAGT	218	60	NM_001101028.1	-3,53	0,999	0,92
<i>ALDH9A1</i>	GCTGCTGGCCGAAATCTATA CACACTTCCAGTGAAGGAGA	133	60	XM_005663148.1	-3,52	0,998	0,93
<i>ATF4</i>	AACATGGCCGAGATGAGCTTCC TCTCCACCATCCAGTCTGTCCC	265	60	NM_001123078.1	-3,36	0,998	0,99
<i>BAK1</i>	AGGACCTGAGAGATGGCGTCC AGTCGTATCGCCGGTTGATGTC	283	60	XM_001928147.2	-3,07	0,999	1,12
<i>BAX</i>	ATGGAGCTGCAGAGGATGATCG ACGTGGGCGTCCCAAAGTAG	289	60	XM_003127290.2	-4,45	0,999	0,68
<i>BBOX1</i>	GTGCCGAAAGCTCAAGGAAAAA CTCTGCCGGCCGTGAAGTAAC	342	60	XM_003122909.3	-3,59	0,999	0,90
<i>BCL2L1</i>	CGTCCCAGCTCCACATCACC CCTTGCTACGCTCTCCACGC	147	60	NM_214285.1	-3,55	0,998	0,91
<i>CASP3</i>	CTGCCGAGGCACAGAATTG CGCCAGGAATAGTAACCAGGTG	135	60	NM_214131.1	-3,38	0,999	0,98
<i>CASP8</i>	AGAAAGATGTCCCAGGGGTGAAGA CAGGGTGAAAGTAGGTTGTGGCA	121	60	NM_001031779.2	-3,50	0,993	0,93
<i>CCL2</i>	CTGCACCCAGGTCCTTGC GACCCACTTCTGCTTGGGTTC	199	60	NM_214214.1	-3,33	0,998	1,00
<i>CD36</i>	TCCTCTGACATTTGCAGGTCAATCT GGAGATGCAAAAGCTGTGGATGG	107	59	NM_001044622.1	-3,59	0,999	0,90
<i>CPT1A</i>	GCATTTGTCCCATCTTTTCGT GCACTGGTCCTTCTGGGATA	198	60	NM_001129805.1	-3,46	0,999	0,95
<i>CPT1B</i>	CACACTGCAGCACCTCACA GTGAGGGCTGCCAGCTTTT	183	60	NM_001007191.1	-4,09	1,000	0,76
<i>CYP11A1</i>	CTGCCATCTTCTGCCTTGTA GCTCTGGCCATTAGAGATCA	314	60	NM_214412.1	-3,58	0,993	0,90
<i>CYP4A24</i>	GGTTTGCTCCTGTTGAATGG GCATCACTTGGACAGACTTG	121	60	NM_214424.1	-3,34	1,000	0,99
<i>DDIT3</i>	CTGAGTCATTGCCTTTCTCCTTCG ACTTTGTTCCGTTTCCTGGGTC	311	60	NM_001144845.1	-3,22	0,999	1,05

<i>DNAJC3</i>	TGTCTCTCAGTGAAGTTCGTGAATG GATTCATATTTGCTGGTCGCATC	160	60	NM_001190184.1	-3,46	0,998	0,94
<i>EDEM1</i>	TGGGTTGGAAAGCAGAGTGGC TTCACATTGACGTAGAGTGGCGG	200	60	XM_005669741.1	-3,20	0,995	1,05
<i>FABP1</i>	ATCGTGCAGAAATGGGAAGCA ACTGAACCACTGTCTTGACC	133	57	NM_001004046.1	-3,43	0,999	0,96
<i>FABP3</i>	CAACATGACCAAGCCTACCA CTAGTTCCCGAACAAGCGTT	227	58	NM_001099931.1	-3,36	1,000	0,98
<i>FABP4</i>	CACCAGGAAGGTGGCTGGCA CCTGTACCAGGGCGCCTCCA	197	60	NM_001002817.1	-3,55	0,998	0,91
<i>FASN</i>	AGCCTAACTCCTCGCTGCAAT TCCTTGGAACCGTCTGTGTTC	196	58	NM_001099930.1	-3,74	0,992	0,85
<i>FBXO32</i>	TCACAGCTCACATCCCTGAG GACTTGCCGACTCTCTGGAC	167	60	NM_001044588.1	-3,30	0,994	1,01
<i>FGF21</i>	CGATACCTCTACACGGATGA CGTTGTAGCCATCCTCAAGA	262	60	NM_001163410.1	-3,67	0,995	0,87
<i>GPAT</i>	ATCGTGGCCTGCCTGCTCCT CATAGGCTGGCGGCCCTCCG	404	64	XM_001927875.1	-3,50	0,994	0,93
<i>GPX1</i>	CTTCGAGAAGTTCTCTGGTGG CCTGGACATCAGGTGTTCTT	232	60	NM_214201.1	-3,66	0,998	0,87
<i>HMGR</i>	GGTCAGGATGCGGCACAGAACG CGCCACGGTCCCGATCTCTATG	127	60	NM_001122988.1	-3,25	0,993	1,03
<i>HMOX1</i>	AGCTGTTTCTGAGCCTCCAA CAAGACGGAACACGAGACA	130	60	NM_001004027.1	-3,54	0,998	0,91
<i>HP</i>	GTTCGCTATCACTGCCAAAC CAGTTTCTCTCCAGTGACCT	108	60	NM_214000.1	-3,52	0,999	0,92
<i>HSP90B1</i>	GCTTGTCGTA AAACTCTGG CACATACTGGTCTAGACTAGT	196	56	NM_214103.1	-3,51	0,999	0,93
<i>HSPA5</i>	TGGAATGACCCGTCTGTGC TGGTGCAAATGTCTTTGTTGC	120	60	XM_001927795.4	-3,57	0,998	0,91
<i>ICAM1</i>	CGGTGGCAGCCGTGGCTATC TTGATGCAGCCCCGCTCGTC	208	60	NM_213816.1	-3,26	0,993	1,03
<i>IL1B</i>	GTTCTCTGAGAAATGGGAGC CTGGTCATCATCACAGAAGG	143	60	NM_214055.1	-3,54	0,989	0,92
<i>IL8</i>	ACTTCCAAACTGGCTGTTGC GGAATGCGTATTTATGCACTGG	120	60	NM_213867.1	-3,79	0,990	0,84
<i>LBP</i>	ACCGCTCCCCAGTTGGCTTC AGCGCGGCGGACACATTAGT	406	62	NM_001128435.1	-3,35	0,992	0,99
<i>LDLR</i>	TGCGAAGATATCGACGAGTG TACGGTCCAGGGTCATCTTC	196	60	NM_001206354.2	-4,03	0,985	0,77
<i>LPL</i>	TTCTCCCGACGACGCAGATTTT TGCAATCACACGGATGGCTTCT	166	60	NM_214286.1	-3,36	0,988	0,98
<i>MVK</i>	CTGTGGCCTTGAACCTTGAGA CTGCTGGATGCCAATGTTTG	92	60	XM_001929184.3	-3,29	0,999	1,01
<i>NQO1</i>	CCAGCAGCCCGGCCAATCTG AGGTCCGACACGGCGACCTC	160	60	NM_001159613.1	3,24	0,985	1,03
<i>PDIA4</i>	CAATGACGCCAAGCGCTAC CACCTCCGTGGCGAAGTC	178	60	NM_001267834.1	-4,45	0,997	0,68
<i>PPP1R15A</i>	GGCAGTAACCAGGGCAGACG TTCCGGGCTCTCTAGGGACG	236	60	XM_003127275.1	-2,78	1,000	1,29
<i>PRDX6</i>	GGCCGCATCCGTTTCCACGA ACTGGATGGCAAGGTCCCGACT	280	60	NM_214408.1	-3,29	0,998	1,01
<i>PSMA1</i>	CCGGAGGCCGTGACTAGGCT GCATCGGCAGTAAGTCCCGCA	274	60	XM_003122965.2	-3,50	0,999	0,93

<i>PSMB1</i>	CTGTGGGGTCTACCAGAGA CCCAGTGTACACGTCCCTCT	194	60	NM_001244353.1	-3,22	0,996	1,05
<i>PTGS2</i>	CACCGCAACGCCTCTACC GCAGTGCAGAGCGACACG	105	62	NM_214321.1	-3,30	0,996	1,01
<i>SA42</i>	GGCATCATTCCTCAAGGAAG CTGATCACTTTAGCAGCCCA	168	60	NM_001044552.1	-3,38	0,999	0,98
<i>SCD</i>	ACGTTGTGCCAGTGAGTCAG GTCTTGGCCTCTTGTGCTTC	206	60	NM_213781.1	-3,55	0,999	0,91
<i>SLC22A5</i>	TGACCATATCAGTGGGCTA AGTAGGGAGACAGGATGCT	384	60	XM_003123912.2	-3,47	0,992	0,94
<i>SLC27A1</i>	GGTTCCAGCCTGTTGAATGT AACAAAACCTTGGTGCTTGG	275	60	NM_001083931.1	-3,38	0,992	0,98
<i>SOD1</i>	TCCATGTCCATCAGTTTGA CTGCCCCAAGTCATCTGGTTT	250	60	NM_001190422.1	-3,46	0,997	0,95
<i>SREBF1</i>	GCGAGTCAAGACCAGTCTC GCTTGCTCCAAGAGGTGTTT	267	60	NM_214157.1	-3,87	0,999	0,81
<i>SREBF2</i>	CGCTCGGAATCCTGCTGTG GGTGCGGGTCCGCGTCGTG	103	60	XM_005658510.1	-3,51	0,996	0,93
<i>TMLHE</i>	GCACCATACAGCTCCAAGT TGGTCTCATCCAGACGAACA	221	60	XM_003135511.2	-3,58	0,998	0,90
<i>TNF</i>	CATGAGCACTGAGAGCATGA CGATAACCTCGAAGTGCAGT	180	60	NM_214022.1	-3,52	0,996	0,92
<i>TP53</i>	ACTAAGCGAGCACTGCCCCAC GTCTGGGCATCCTTCAGCTCC	155	63	NM_213824.3	-3,53	0,999	0,92
<i>TRIM63</i>	ATGGAGAACCTGGAGAAGCA ACGGTCCATGATCACCTCAT	219	60	NM_001184756.1	-3,62	0,998	0,89
<i>TXNRD1</i>	CTTTACCTTATTGCCCGGGT GTTACCGATTTTGTGGCC	162	60	NM_214154.3	-3,25	0,996	1,03
<i>UBB</i>	GGTGGCTGCTAATTCTCCAG TTTTGGACAGGTTTCAGCTATTAC	127	60	NM_001105309.1	-3,51	1,000	0,93
<i>UBE2B</i>	CCAAATAAACCGCCAACTGT GTTCAACAATGGCCGAAACT	250	60	NM_001257356.1	-3,51	1,000	0,93
<i>UCP3</i>	GCCACTTTGTCTCTGCCTTC CAAACATCACACGTTCCAG	219	60	NM_214049.1	-3,39	1,000	0,97

*Bestimmungskoeffizient der Eichkurve

** E = Effizienz. Die Effizienz wurde unter Verwendung der Formel $E=10^{(-1/\text{Slope})}-1$ ermittelt (Bustin *et al.*, 2009).
Abkürzungen: *ACACA* Acetyl-CoA carboxylase alpha; *ACOX1* Acyl-CoA oxidase 1; *ALDH9A1* Aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1; *ATF4* Activating transcription factor 4; *BAK1* BCL2-antagonist/killer 1; *BAX* BCL2-associated X protein; *BBOX1* Butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase (gamma-butyrobetaine hydroxylase) 1; *BCL2L1* BCL2-like 1; *bp* Basenpaare; *CASP3* Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase; *CASP8* Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase; *CCL2* Chemokine (C-C motif) ligand 2; *CD36* CD36 molecule (thrombospondin receptor); *CPT1A* Carnitine palmitoyltransferase 1A (liver); *CPT1B* Carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle); *CYP1A1* Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1; *CYP4A24* Cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 24; *DDIT3* DNA-damage-inducible transcript 3; *DNAJC3* DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3; *EDEM1* ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1; *FABP1* Fatty acid binding protein 1, liver; *FABP3* Fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor); *FABP4* Fatty acid binding protein 4, adipocyte; *FASN* Fatty acid synthase; *FBXO32* F-box protein 32; *FGF21* Fibroblast growth factor 21; *GPAT* Glycerol-3-phosphate acyltransferase; *GPX1* Glutathione peroxidase 1; *HMGCR* 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; *HMOX1* Heme oxygenase (decycling) 1; *HP* Haptoglobin; *HSP90B1* Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1; *HSPA5* Heat shock 70kDa protein 5; *ICAM1* Intercellular adhesion molecule 1; *IL1B* Interleukin 1, beta; *IL8* Interleukin 8; *LBP* Lipopolysaccharide binding protein; *LDLR* Low density lipoprotein receptor; *LPL* Lipoprotein lipase; *MVK* Mevalonate kinase; *NQO1* NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1; *PDIA4* Protein disulfide isomerase family A, member 4; *PPP1R15A* Protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A; *PRDX6* Peroxiredoxin 6; *PSMA1* Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1; *PSMB1* Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1; *PTGS2* Prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *SA42* Serum amyloid A2; *SCD* Stearoyl-CoA desaturase

(delta-9-desaturase); *SLC22A5* Solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5; *SLC27A1* Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1; *SOD1* Superoxide dismutase 1, soluble; *SREBF1* Sterol regulatory element binding transcription factor 1; *SREBF2* Sterol regulatory element binding transcription factor 2; *T_A* Annealing-Temperatur; *TMLHE* Trimethyllysine hydroxylase, epsilon; *TNF* Tumor necrosis factor; *TP53* Tumor protein p53; *TRIM63* Tripartite motif containing 63, E3 ubiquitin protein ligase; *TXNRD1* Thioredoxin reductase 1; *UBB* Ubiquitin B; *UBE2B* Ubiquitin-conjugating enzyme E2B; *UCP3* Uncoupling protein 3.

4. 5. 7. 6 Gelelektrophorese

Zur RNA-Gelelektrophorese wurde ein 1 %iges Agarosegel (1,5 g Agarose, 150 ml 1 x TAE-Puffer) unter Verwendung von 2 µl *GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain* (Biotum, Hayward, USA) hergestellt. Als Gellaufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. 2 µl RNA wurden mit 8 µl DEPC-H₂O und 2 µl 5 x RNA-Ladepuffer versetzt und bei 65 °C und 900 U/min für 3 min im Thermoschüttler (Eppendorf AG, Deutschland) inkubiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 Volt. Die RNA-Banden wurden mit Hilfe des GeneFlash (VWR, Darmstadt, Deutschland) durch UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht, wobei die intakte 28S-Bande die doppelte Intensität der 18S-Bande aufweisen sollte.

Zur DNA-Gelelektrophorese wurde ein 1,5 %iges Agarosegel (2,25 g Agarose, 150 ml 1 x TAE-Puffer) unter Verwendung von 3,5 µl *GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain* (Biotum, Hayward, USA) hergestellt. Als Gellaufpuffer wurde ebenfalls 1 x TAE-Puffer verwendet. Die qPCR-Produkte wurden mit 5 µl Green GoTaq[®] Flexi Buffer versetzt. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter GeneRulerTM 100 bp (Fermentas, Schwerte, Deutschland) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 Volt. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des GeneFlash (VWR, Darmstadt, Deutschland) durch UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte anhand des Vergleichs mit den bekannten Größen der DNA-Leiter.

4.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte anhand der Statistiksoftware Minitab[®] (Version 13, Minitab Ltd., Michigan, USA). Es wurde jeweils eine Behandlungsguppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Daten wurden mittels des Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Normalverteilte Daten wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), nicht normalverteilte Daten mittels des Test nach Kruskal-Wallis ausgewertet.

Wurden zwei Biopsien im gleichen Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen, wurden die Daten im Verhältnis zur Kontrollgruppe zum ersten Zeitpunktes angegeben und mittels allgemeinem linearem Modell (*General Linear Model*) berechnet. Als Faktoren wurde der Laktationsstatus, der Biopsieentnahmezeitpunkt, sowie die Interaktion zwischen den beiden Faktoren berücksichtigt.

Bei P-Werten kleiner 0,05 wurde das Ergebnis als signifikant angesehen. Im Text dargestellte Daten repräsentieren Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD).

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse aus Versuch 1 zur Untersuchung laktationsbedingter Veränderungen

5.1.1 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

5.1.1.1 Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des UPS in der Muskulatur zur Untersuchung laktationsbedingter Veränderungen

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Laktation auf Gene des UPS bezüglich des Proteinsabbaus wurden Muskelbiopsien des 10. (n=20) und 20. Laktationstages (n=20) untersucht. Für die Analyse wurde *UBB* (Ubiquitin B), das E2-Enzym *UBE2B* (Ubiquitin-conjugating enzyme E2B), die E3-Ligasen *FBXO32* (*F-box Protein 32*) und *TRIM63* (*Tripartite Motif Containing 63*), als auch die proteasomalen Untereinheiten *PSMA1* (*Proteasome subunit, alpha type-1*) und *PSMB1* (*Proteasome subunit, beta type-1*) untersucht.

Wie aus Tabelle 28 hervorgeht, wies die laktierende Gruppe am 10. Tag der Laktation keine Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Zum Zeitpunkt der zweiten Biopsie waren die relativen mRNA-Konzentrationen von *UBB* und *PSMA1* der Kontrolle als auch der laktierenden Gruppe angestiegen ($P < 0,05$). Zusätzlich zeigten in der Laktationsgruppe relative mRNA-Konzentrationen von *UBE2B* und *PSMB1* erhöhte Werte auf ($P < 0,05$). Daraus resultierend ergab sich einen signifikanten Einfluss des Biopsieentnahmezeitpunktes bei allen untersuchten Genen mit Ausnahme von *FBXO32*. Die Laktation spielte bei *UBE2B* und *PSMB1* eine signifikante Rolle. Interaktionen der beiden Faktoren kamen bei *UBE2B* und *PSMB1* in der Laktation zum zweiten Biopsiezeitpunkt vor.

Tabelle 28: Auswirkungen der Laktation auf die relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des UPS in der Muskulatur der nicht-laktierenden (Kontrolle) und laktierenden Gruppe zu beiden Biopsieentnahmezeitpunkten.

Gen	Kontrolle	Laktierend	Kontrolle	Laktierend	General Linear Model		
	1. Biopsie		2. Biopsie		Laktation	Biopsie	L*B
<i>FBXO32</i>	1 ± 0,35	1,19 ± 0,53	0,99 ± 0,41	1,14 ± 0,46	n. s.	n. s.	n. s.
<i>PSMA1</i>	1 ± 0,15	0,89 ± 0,19	1,22 ± 0,13*	1,33 ± 0,12*	n. s.	< 0,001	n. s.
<i>PSMB1</i>	1 ± 0,15	0,97 ± 0,22	1,08 ± 0,14	1,36 ± 0,06*	< 0,05	< 0,001	< 0,05
<i>TRIM63</i>	1 ± 0,14	0,98 ± 0,20	1,23 ± 0,36	1,37 ± 0,46	n. s.	< 0,05	n. s.
<i>UBB</i>	1 ± 0,07	0,99 ± 0,09	1,78 ± 0,11*	2,00 ± 0,33*	n. s.	< 0,001	n. s.
<i>UBE2B</i>	1 ± 0,14	0,98 ± 0,12	1,10 ± 0,13	1,38 ± 0,21*	< 0,05	< 0,001	< 0,05

Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der ersten Biopsie. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der ersten Biopsie (P < 0,05). Ergebnisse des *General Linear Model* beschreiben die Abhängigkeit von den einzelnen Faktoren, sowie deren Interaktion (L*B).

Abkürzungen: *FBXO32* F-box protein 32; *PSMA1* Proteasome subunit, alpha type-1; *PSMB1* Proteasome subunit, beta type-1; *TRIM63* Tripartite motif containing 63; *UBB* Ubiquitin B; *UBE2B* Ubiquitin-conjugating enzyme E2B.

5. 1. 1. 2 Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR in der Leber zur Untersuchung laktationsbedingter Veränderungen

Untersucht wurden Gene der *Unfolded Protein Response*, die Chaperone *HSPA5*, *HSP90B1* und *DNAJC3*, die Proteindisulfidisomerase *PDIA4*, *EDEM1* als Vertreter des *ERAD*, *ATF4* aus dem Signalweg von *PERK*, *DDIT3* als wichtigster Induktor der ER-Stress-induzierten Apoptose, sowie pro- und antiapoptotische Gene *BCL2*, *BAX*, *BAK-1*, *TP53*, *CASP3* und δ , als auch *PPP1R15A*, als negativen Autoregulationseinheit. Darüber hinaus wurde auch das ER-Stress- und PPAR α -Zielgen *Fibroblast Growth Factor 21* (*FGF21*) analysiert.

In der Leber konnte gezeigt werden, dass die Laktation bei sieben von 14 Gene der UPR zu einer erhöhten Expression führte (P < 0,05; Tab. 29). Hierzu zählten *ATF4*, *CASP3*, *DDIT3*, *HSPA5*, *HSP90B1* und *PDIA4*. *DNAJC3* zeigte gegenüber der Kontrolle nur eine tendenzielle verminderter relative mRNA-Konzentration. *FGF21* zeigte ebenfalls eine gesteigerte Expression. Ergebnisse sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Auswirkungen der Laktation auf die relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR in der Leber der nicht-laktierenden (Kontrolle) und laktierenden Gruppe

Gen	Kontrolle	Laktierend
<i>ATF4</i>	1 ± 0,22	2,21 ± 0,62*
<i>BAK1</i>	1 ± 0,47	0,60 ± 0,31
<i>BAX</i>	1 ± 0,19	1,09 ± 0,18
<i>BCL2</i>	1 ± 0,42	1,05 ± 0,57
<i>CASP3</i>	1 ± 0,37	1,97 ± 0,89*
<i>CASP8</i>	1 ± 0,36	1,06 ± 0,52
<i>DDIT3</i>	1 ± 0,29	1,60 ± 0,23*
<i>DNAJC3</i>	1 ± 0,46	1,91 ± 1,09 [#]
<i>EDEMI</i>	1 ± 0,23	1,16 ± 0,55
<i>HSP90B1</i>	1 ± 0,56	2,24 ± 0,79*
<i>HSPA5</i>	1 ± 0,38	2,44 ± 0,51*
<i>PDIA4</i>	1 ± 0,41	3,91 ± 2,03*
<i>PPP1R15A</i>	1 ± 0,20	1,16 ± 0,37
<i>TP53</i>	1 ± 0,34	0,90 ± 0,33
<i>FGF21</i>	1 ± 0,55	7,84 ± 3,71*

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$), # = Tendenziell signifikant ($P \leq 0,1$).

Abkürzungen: *ATF4* Activating transcription factor 4; *BAK1* BCL2-antagonist/killer 1; *BAX* BCL2-associated X protein; *BCL2* B-cell CLL/lymphoma 2; *CASP3* Caspase 3; *CASP8* Caspase 8; *DDIT3* DNA-damage-inducible transcript 3; *DNAJC3* DnaJ homolog, subfamily C, member 3; *EDEMI* ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-1; *HSP90B1* Heat shock protein 90kDa beta, member 1; *HSPA5* Heat shock 70kDa protein A5; *PDIA4* Protein disulfide isomerase family A, member 4; *PPP1R15A* Protein phosphatase 1 15A; *TP53* Tumor protein 53; *FGF21* Fibroblast growth factor 21.

In der Muskulatur wurden zwei Biopsieentnahmezeitpunkte (Tag 10 und 20 der Laktation) berücksichtigt (Tab. 30). Am 10. Tag der Laktation zeigten nur zwei der 13 gemessenen Genen (*BAX*, *BCL2*) signifikant erhöhte mRNA-Konzentrationen ($P < 0,05$; Tab. 30), alle weiteren blieben unverändert. Zum zweiten Entnahmezeitpunkt waren die mRNA-Konzentrationen bei vier der gemessenen Gene (*HSPA5*, *HSP90B1*, *PPP1R15A*, *TP53*; $P < 0,05$; Tab. 30) in der Kontrollgruppe und sechs mRNA-Konzentrationen der gemessenen Gene in der laktierenden Gruppe (*BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *HSPA5*, *HSP90B1*, *PPP1R15A*; $P < 0,05$; Tab. 30) gegenüber der ersten Probenentnahme erhöht. Der Faktor der Laktation nahm

signifikanten Einfluss auf den größten Teil der untersuchten Gene. Zwischen erster und zweiter Biopsie kamen kaum Unterschiede vor. Eine Interaktion der beiden Faktoren trat nur bei *HSP90B1* zum zweiten Biopsiezeitpunkt in der Laktation auf. Eine Bestimmung von *BAK1* war in der Muskulatur, im Gegensatz zur Leber, nicht möglich.

Tabelle 30: Auswirkungen der Laktation auf die relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR in der Muskulatur nicht-laktierenden (Kontrolle) und laktierenden Gruppe zu beiden Biopsieentnahmezeitpunkten

Gen	Kontrolle	Laktierend	Kontrolle	Laktierend	General Linear Model		
	1. Biopsie				Laktation	Biopsie	L*B
<i>ATF4</i>	1 ± 0,22	0,97 ± 0,27	0,88 ± 0,20	0,83 ± 0,19	n. s.	n. s.	n. s.
<i>BAX</i>	1 ± 0,38	2,24 ± 0,46*	1,24 ± 0,51	2,24 ± 0,48*	< 0,001	n. s.	n. s.
<i>BCL2</i>	1 ± 0,14	1,44 ± 0,45*	0,76 ± 0,16*	1,30 ± 0,41*	< 0,001	n. s.	n. s.
<i>CASP3</i>	1 ± 0,20	1,39 ± 0,74	1,04 ± 0,13	1,93 ± 0,26*	< 0,001	< 0,05	n. s.
<i>CASP8</i>	1 ± 0,22	0,86 ± 0,33	0,98 ± 0,13	0,72 ± 0,21	< 0,05	n. s.	n. s.
<i>DDIT3</i>	1 ± 0,30	0,82 ± 0,31	0,78 ± 0,26	0,48 ± 0,17*	< 0,05	< 0,05	n. s.
<i>DNAJC3</i>	1 ± 0,28	1,01 ± 0,16	0,87 ± 0,14	1,00 ± 0,24	n. s.	n. s.	n. s.
<i>EDEMI</i>	1 ± 0,35	1,22 ± 0,41	0,97 ± 0,15	1,30 ± 0,43	< 0,05	n. s.	n. s.
<i>HSP90B1</i>	1 ± 0,19	1,07 ± 0,23	1,47 ± 0,19*	1,99 ± 0,43*	< 0,05	< 0,001	< 0,05
<i>HSPA5</i>	1 ± 0,20	0,84 ± 0,37	1,48 ± 0,22*	1,55 ± 0,27*	n. s.	< 0,001	n. s.
<i>PDIA4</i>	1 ± 0,35	1,13 ± 0,45	0,85 ± 0,12	1,24 ± 0,29	< 0,05	n. s.	n. s.
<i>PPP1R15A</i>	1 ± 0,38	1,06 ± 0,42	2,84 ± 1,09*	2,61 ± 0,97*	n. s.	< 0,001	n. s.
<i>TP53</i>	1 ± 0,24	0,92 ± 0,28	1,22 ± 0,15*	1,06 ± 0,36	n. s.	≤ 0,05	n. s.

Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der ersten Biopsie. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der ersten Biopsie (P < 0,05). Ergebnisse des *General Linear Model* beschreiben die Abhängigkeit von den einzelnen Faktoren, sowie deren Interaktion (L*B). * Signifikanz nach Einzelauswertung der Gruppe gegenüber der Kontrolle zum Zeitpunkt der ersten Biopsie.

Abkürzungen: *ATF4* Activating transcription factor 4; *BAX* BCL2-associated X protein; *BCL2* B-cell CLL/lymphoma 2; *CASP3* Caspase 3; *CASP8* Caspase 8; *DDIT3* DNA-damage-inducible transcript 3; *DNAJC3* DnaJ homolog, subfamily C, member 3; *EDEMI* ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-1; *HSP90B1* Heat shock protein 90kDa beta, member 1; *HSPA5* Heat shock 70kDa protein A5; *PDIA4* Protein disulfide isomerase family A, member 4; *PPP1R15A* Protein phosphatase 1 15A; *TP53* Tumor protein 53.

5. 1. 1. 3 Relative mRNA-Konzentrationen der SREBPs und zugehöriger Zielgene in der Leber zur Untersuchung laktationsbedingter Veränderungen

Das Lebergewebe, das am Tag 20 der Laktation gewonnen wurde, mittels Genexpressionsanalysen zu *SREBP-1c* und *SREBP-2* untersucht. Bezüglich der Zielgene von *SREBP-1c* wurden die relativen mRNA-Konzentrationen der Acetyl-CoA Carboxylase α (*ACACA*), der Fettsäuresynthase (*FASN*), der Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (*GPAT*) und der Stearoyl-CoA-Desaturase (*SCD*) ermittelt. Zu den untersuchten *SREBP-2*-Zielgenen zählten die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (*HMGCR*), der *Low Density Lipoprotein Receptor* (*LDLR*) und die Mevalonatkinase (*MVK*).

Wie aus Tabelle 31 zu entnehmen ist, ist nur bei *SREBF1* eine signifikante Erhöhung der relative mRNA-Konzentrationen um das 3,1-fache ($P < 0,05$) zu beobachten. Andere Zielgene zeigen zwar eine erhöhte Konzentration, jedoch konnte hierbei keine signifikante Abhängigkeit gezeigt werden. Die relativen mRNA-Konzentrationen von *SREBF2* und dessen Zielgene blieben gegenüber der Kontrolle unverändert.

Tabelle 31: Auswirkungen der Laktation auf die relative mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ausgewählter Zielgene in der Leber nicht-laktierenden (Kontrolle) und laktierenden Gruppe

Gen	Kontrolle	Laktierend
<i>SREBF1</i>	1 ± 0,39	3,13 ± 2,02*
<i>ACACA</i>	1 ± 0,31	1,37 ± 0,57
<i>FASN</i>	1 ± 0,49	1,37 ± 0,97
<i>GPAT</i>	1 ± 0,28	1,01 ± 0,22
<i>SCD</i>	1 ± 0,19	1,15 ± 0,79
<i>SREBF2</i>	1 ± 0,20	1,17 ± 0,60
<i>HMGCR</i>	1 ± 0,22	1,47 ± 1,14
<i>LDLR</i>	1 ± 0,15	1,08 ± 0,64
<i>MVK</i>	1 ± 0,20	1,57 ± 1,13

Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe), * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (P < 0,05).

Abkürzungen: *ACACA* Acetyl-CoA carboxylase α ; *FASN* Fatty acid synthase; *GPAT* Glycerol-3-phosphat-acyltransferase; *HMGCR* 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; *LDLR* Low density lipoprotein receptor; *MVK* Mevalonate kinase; *SCD* Stearoyl-CoA desaturase; *SREBF1* Sterol regulatory element binding transcription factor 1; *SREBF2* Sterol regulatory element binding transcription factor 2.

5.2 Ergebnisse aus Versuch 2 zur Untersuchung der Auswirkungen der Behandlungen mit Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion

5.2.1 Gewichtsentwicklung, Futteraufnahme und Energiebilanz der Sauen

Die Gewichte der Sauen betrugen zu Versuchsbeginn im Durchschnitt etwa 269 kg (SD ± 19,9 kg). Die Lebendmasseverluste im Verlauf der Laktation unterschieden sich nicht von der der Kontrollgruppe.

Die Kontroll-, Fischöl- und Clofibratgruppe nahmen etwa gleich viel auf Futter auf (Tab. 32). Die Gruppe unter Energierestriktion nahm signifikant weniger Futter gegenüber den übrigen Gruppen auf. Trotz des bedarfdeckenden Angebots an Energie über das Futter, konnten die Kontroll-, Fischöl- und Clofibratgruppe ihren täglichen Energiebedarf von durchschnittlich 91,4 ± 8,16 MJ ME nicht vollends decken, da sie nicht jeden Tag die vorgelegte Menge an Futter vollständig aufnahmen. Sie befanden sich daher in einer leicht negativen Energiebilanz (Tab. 32). Die restriktiv gefütterte Gruppe zeigte gegenüber den anderen Gruppen eine signifikant stärker negativere Energiebilanz (Tab. 32).

Tabelle 32: Tägliche Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung und -verluste und Energiebilanz der Kontroll- und Behandlungsgruppen

	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
Futteraufnahme (kg/d)				
1. Woche p. p.	6,06 ± 0,56	5,73 ± 0,82	5,47 ± 0,75	5,22 ± 0,09*
2. Woche p. p.	5,88 ± 0,91	6,51 ± 0,36	6,26 ± 0,63	5,13 ± 0,16*
3. Woche p. p.	6,29 ± 0,57	6,02 ± 0,75	6,28 ± 0,97	4,69 ± 0,96*
1. - 3. Woche p. p.	6,08 ± 0,54	6,09 ± 0,44	6,00 ± 0,67	5,01 ± 0,33*
Lebendmasse (kg)				
1. Tag p. p.	264 ± 15,4	267 ± 23,6	263 ± 18,3	282 ± 17,7
21. Tag p. p.	247 ± 21,0	256 ± 21,9	242 ± 27,9	259 ± 22,7
Lebendmasseverluste (kg)				
1. - 21. Tag p. p.	16,9 ± 9,14	10,8 ± 7,48	20,9 ± 16,4	23,9 ± 17,6
Energiebedarf (MJ ME/d)				
1. - 21. Tag p. p.	91,3 ± 9,73	90,4 ± 8,38	92,5 ± 7,29	92,7 ± 7,72
Energieaufnahme (MJ ME/d)				
1. - 21. Tag p. p.	83,8 ± 7,39	84,0 ± 6,05	82,8 ± 9,30	69,2 ± 4,61*
Energiebilanz (MJ ME/d)				
1. - 14. Tag p. p.	-4,91 ± 13,3	-5,23 ± 8,03	-9,24 ± 8,80	-23,5 ± 11,9*

Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe), * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (P < 0,05).

Abkürzungen: p. p. post partum.

5. 2. 2 Gewichtsentwicklung der Ferkel

Alle Würfe wiesen ähnliche Lebendmassen auf und ihre täglichen Zunahmen unterschieden sich nicht (Tab. 33).

Tabelle 33: Gewichtsentwicklung der Würfe der Kontroll- und Behandlungsgruppen

	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
Wurfgewichte (kg)				
Geburt	12,5 ± 1,28	12,7 ± 1,65	12,8 ± 1,58	13,5 ± 1,65
14. Tag p. p.	40,4 ± 3,70	41,7 ± 3,55	42,3 ± 4,24	44,5 ± 6,46
21. Tag p. p.	57,4 ± 6,09	56,8 ± 6,13	58,9 ± 5,22	58,5 ± 6,57
Wurfzunahmen (kg)				
1. - 14. Tag p. p.	28,0 ± 4,09	29,0 ± 3,20	29,5 ± 3,96	30,9 ± 5,79
1. - 21. Tag p. p.	45,0 ± 6,88	44,1 ± 5,78	46,1 ± 5,25	45,0 ± 5,86

Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe).

Abkürzungen: *p. p.* post partum.

5. 2. 3 Zusammensetzung der Sauenmilch

Die Milchproben wurden am Höhepunkt der Milchproduktion am 20. Tag post partum entnommen und auf den Gehalt an Protein, Fett und Laktose untersucht. Des Weiteren wurde die Konzentration an Vitamin A (Retinol) und Vitamin E (α - und γ -Tocopherol) ermittelt und das Fettsäuremuster bestimmt. Es wurden auch die Konzentrationen an L-Carnitin und Acetyl-Carnitin in der Milch analysiert. Tabelle 34 zeigt einen Überblick über die gemessenen Werte. Das Fettsäuremuster ist separat dargestellt (Tab. 35).

5. 2. 3. 1 Gehalte an Protein, Fett und Laktose und Energie

Im Hinblick auf die Fett- und Laktosegehalte traten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf (Tab. 34). Die Gehalte an Protein waren in der Milch der Behandlungsgruppen mit Fischöl und Clofibrat signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($P < 0,05$; Tab. 34). Die Milch der Fischölgruppe enthielten 12 %, die der Clofibratgruppe 9 % mehr Protein als die Milch der Kontrolle. Anhand der Gehalte an Fett, Laktose und Protein konnte der Energiegehalt der Milch berechnet werden (Tab. 34). Die einzelnen Gruppen wichen diesbezüglich nicht maßgebend von der Kontrollgruppe ab; der Energiegehalt betrug im Mittel 4,85 MJ/kg.

5. 2. 3. 2 Fett-Protein-Quotient

Aus den Konzentrationen an Fett und Protein der Milch konnte der Fett-Protein-Quotient ermittelt werden. Die Fischölgruppe unterschied sich in diesem Wert signifikant von der Kontrollgruppe ($P < 0,05$; Tab. 34). Die Behandlungsgruppen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert.

5. 2. 3. 3 Konzentrationen an Vitamin A und E

Da es sich bei Vitamin A und - E um fettlösliche Vitamine handelt, wurde der Vitamingehalt neben dem absoluten Gehalt, auch auf den Fettgehalt der Milch bezogen. Hinsichtlich der Konzentrationen an Retinol pro Liter Milch bzw. pro Gramm Fett lagen in den drei Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe vor (Tab. 34). Die Konzentration von α -Tocopherol war in der Milch ebenfalls unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die gemessene Konzentrationen an γ -Tocopherol pro Liter Milch und pro Gramm MilCHFett zeigte hingegen in der Gruppe mit FischöLzulage gegenüber den anderen Gruppen erniedrigte Werte ($P < 0,05$; Tab 34).

5. 2. 3. 4 Konzentrationen an L-Carnitin, Acetyl-Carnitin und Gesamtcarnitin

Die Konzentration an Gesamtcarnitin ergibt sich aus den Konzentrationen von L-Carntin und Acetyl-Carnitin. Diese zeigten in den Behandlungsgruppen keinen signifikanten Unterschied zu den Konzentrationen der Kontrollgruppe (Tab. 34).

Tabelle 34: Überblick über die Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die Zusammensetzung der Milch der Sauen am 20. Tag post partum

	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
Energiegehalt				
(MJ/kg)	4,73 ± 0,22	4,73 ± 0,43	4,91 ± 0,47	5,03 ± 0,53
Protein				
(g/100g)	5,19 ± 0,39	5,83 ± 0,24*	5,66 ± 0,30*	5,50 ± 0,40
Fett				
(g/100g)	6,81 ± 0,49	6,46 ± 0,99	6,92 ± 1,15	7,36 ± 1,36
Laktose				
(g/100g)	4,85 ± 0,47	4,76 ± 0,50	5,04 ± 0,42	4,95 ± 0,52
Fett-Protein-Quotient	1,32 ± 0,14	1,11 ± 0,15*	1,23 ± 0,22	1,35 ± 0,28
Retinol				
(µmol/l)	1,10 ± 0,25	1,39 ± 0,50	1,23 ± 0,33	1,34 ± 0,58
(nmol/g Fett)	16,1 ± 3,74	21,8 ± 7,64	17,9 ± 4,46	18,5 ± 7,73
α-Tocopherol				
(µmol/l)	5,71 ± 1,99	6,43 ± 2,06	6,53 ± 1,54	6,40 ± 2,07
(nmol/g Fett)	83,4 ± 27,1	101 ± 32,5	95,9 ± 24,1	89,0 ± 31,7
γ-Tocopherol				
(µmol/l)	0,08 ± 0,02	0,03 ± 0,02*	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,02
(nmol/g Fett)	1,15 ± 0,34	0,47 ± 0,26*	1,35 ± 0,46	1,08 ± 0,33
Gesamtcarnitin				
(µmol/l)	94,6 ± 21,9	84,2 ± 7,4	96,4 ± 17,1	73,9 ± 16,8
L-Carnitin				
(µmol/l)	63,8 ± 17,6	52,9 ± 8,15	66,3 ± 10,0	50,2 ± 11,7
Acetyl-Carnitin				
(µmol/l)	30,8 ± 8,59	31,2 ± 7,80	30,2 ± 8,83	23,7 ± 5,84

Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe), * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (P < 0,05).

5. 2. 3. 5 Fettsäuremuster

Das Fettsäuremuster der gewonnen Milchproben wurde als prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren ermittelt. Fettsäuren unterhalb von C 12:0 (Laurinsäure) waren in nur geringem Maße vorhanden ($< 0,05$ g/100g Gesamtfettsäuren) und wurden daher nicht berücksichtigt. Tabelle 35 zeigt die Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Gruppen.

Die Gruppe mit Fischölgabe zeigte gegenüber den anderen Gruppen einen größeren Anteil an ω 3-Fettsäuren ($P < 0,001$, Tab. 35), mitunter von C 20:5 ω 3 (Eicosapentaensäure, EPA) und C 22:5 ω 3 (Docosapentaensäure). C 22:6 ω 3 (Docosahexaensäure, DHA) konnten ausschließlich in der Milch dieser Gruppe nachgewiesen werden. Ebenfalls konnten hier signifikant höhere Anteile gesättigter Fettsäuren im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (C 14:0 (Myristinsäure), C 16:0 (Palmitinsäure), C 18:0 (Stearinsäure), $P \leq 0,05$). Obwohl einzelne einfach ungesättigte Fettsäuren ebenfalls einen höheren Anteil im Fettsäuremuster gegenüber der Kontrollgruppe einnahmen (C 16:1 ω 9 (Palmitoleinsäure), C 18:1 ω 7 (Vaccensäure) C 20:1 (Gadoleinsäure)), war der Anteil der gesamten einfach ungesättigten Fettsäuren aufgrund eines deutlich verminderten Anteils an C 18:1 ω 9 (Ölsäure) in der Fischölgruppe in Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger. Der Anteil an ω 6-Fettsäuren war gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt ($P < 0,05$).

In der Clofibratgruppe nahmen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in ihrem Anteil ab, der Anteil der gesättigten Fettsäuren stieg hingegen an ($P < 0,05$; Tab. 35). Auch war der Anteil an ω 6-Fettsäuren niedriger als in der Kontrollgruppe. Alle weiteren Fettsäureanteile blieben im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert.

Die Gruppe mit Energierestriktion zeigte gegenüber der Kontrollgruppe keine nennenswerten Veränderungen bezüglich der Verteilung an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren (Tab. 35).

Tabelle 35: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die Verteilung der Fettsäuren in Sauenmilch; angegeben in g/100g Gesamtfettsäuren

Fettsäuren	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
C 12:0	0,72 ± 0,13	0,56 ± 0,20	0,67 ± 0,14	0,67 ± 0,21
C 14:0	4,53 ± 0,66	6,17 ± 0,55*	4,59 ± 0,64	4,17 ± 0,43
C 14:1	0,46 ± 0,12	0,51 ± 0,11	0,42 ± 0,09	0,36 ± 0,09*
C 16:0	27,1 ± 1,60	30,4 ± 2,44*	30,1 ± 2,04*	26,1 ± 1,08
C 16:1 ω9	12,4 ± 1,62	14,6 ± 2,62*	12,1 ± 1,03	10,8 ± 1,45
C 18:0	2,85 ± 0,36	3,35 ± 0,53*	3,02 ± 0,38	3,34 ± 0,54
C 18:1 ω9 cis	31,7 ± 3,51	23,8 ± 5,29*	30,8 ± 3,19	35,2 ± 2,45*
C 18:1 ω7	1,85 ± 0,27	2,52 ± 0,22*	1,88 ± 0,21	2,26 ± 0,35*
C 18:2 ω6 cis	15,2 ± 0,35	9,33 ± 0,47*	13,7 ± 0,73*	14,3 ± 1,34
C 18:3 ω6	0,11 ± 0,07	0,18 ± 0,12	0,11 ± 0,05	0,12 ± 0,04
C 18:3 ω3	1,18 ± 0,10	1,01 ± 0,08*	1,04 ± 0,12*	1,01 ± 0,02*
C 20:0	0,14 ± 0,14	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,07 ± 0,02
C 20:1	0,20 ± 0,08	0,34 ± 0,08*	0,15 ± 0,06	0,24 ± 0,10
C 20:2	0,15 ± 0,07	0,18 ± 0,08	0,13 ± 0,06	0,18 ± 0,07
C 20:3 ω6	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,02*	0,11 ± 0,05
C 20:4 ω6	0,62 ± 0,16	0,55 ± 0,10	0,58 ± 0,13	0,58 ± 0,16
C 20:3 ω3	n. n.	0,13 ± 0,14	n. n.	n. n.
C 20:5 ω3	0,26 ± 0,10	3,38 ± 0,74*	0,25 ± 0,08	0,25 ± 0,09
C 22:2	n. n.	0,19 ± 0,16	n. n.	n. n.
C 22:5 ω3	0,47 ± 0,20	1,10 ± 0,26*	0,43 ± 0,19	0,40 ± 0,15
C 22:6 ω3	n. n.	1,69 ± 0,42	n. n.	n. n.
Summe				
SFA	35,3 ± 2,10	40,5 ± 3,23*	38,5 ± 2,66*	34,3 ± 1,73
MUFA	46,6 ± 2,55	41,7 ± 3,68*	45,3 ± 2,61	48,9 ± 1,55
PUFA	18,1 ± 0,69	17,8 ± 1,14	16,3 ± 0,85*	16,8 ± 1,88
ω3-Fettsäuren	1,91 ± 0,23	7,31 ± 1,37*	1,71 ± 0,19	1,65 ± 0,29
ω6-Fettsäuren	16,0 ± 0,50	10,1 ± 0,50*	14,4 ± 0,78*	15,0 ± 1,62

Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe). * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (P < 0,05).

Abkürzungen: *n. n.* nicht nachweisbar (< 0,05 g/100g Gesamtfettsäuren); *SFA* Saturated Fatty Acids; *MUFA* Monounsaturated Fatty Acids; *PUFA* Polyunsaturated Fatty Acids.

5. 2. 4 Biochemische Parameter im Plasma

5. 2. 4. 1 Plasmakonzentrationen an freien Fettsäuren

Zur Untersuchung der Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe während der Laktation wurden die Konzentrationen an freien Fettsäuren im Plasma bestimmt. Hier zeigte sich nur in der Gruppe mit Clofibratzulage eine verminderte Konzentration (Tab. 36). Die Werte aller übrigen Gruppen blieben im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert.

5. 2. 4. 2 Plasmakonzentrationen an L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, Gesamtcarnitin, γ -Butyrobetain und Trimethyllysin

Zur Untersuchung des Carnitinstatus wurde im Plasma die Konzentrationen an L-Carnitin, Acetyl-Carnitin und dessen Vorstufen γ -Butyrobetain und Trimethyllysin bestimmt. Das Gesamtcarnitin ergibt sich aus den Konzentrationen von L-Carntin und Acetyl-Carnitin. Bei γ -Butyrobetain ergab sich in der Clofibratgruppe eine erhöhte Konzentration und in der restriktiv gefütterten Gruppe ein verminderte Konzentration ($P < 0,05$; Tab. 36). Die übrigen Parameter zeigten bei den Behandlungsgruppen keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 36)

Tabelle 36: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die Konzentrationen freier Fettsäuren und Gesamtcarnitin, L-Carntin, Acetyl-Carnitin, γ -Butyrobetain und Trimethyllysin im Plasma laktierender Saunen

	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
Freie Fettsäuren				
($\mu\text{mol/l}$)	$150 \pm 65,6$	$113 \pm 54,7$	$64 \pm 18,2^*$	$83 \pm 18,1$
Gesamtcarnitin				
($\mu\text{mol/l}$)	$10,7 \pm 0,94$	$10,8 \pm 1,52$	$10,6 \pm 1,03$	$10,2 \pm 1,40$
L-Carnitin				
($\mu\text{mol/l}$)	$9,64 \pm 0,73$	$9,79 \pm 1,52$	$9,72 \pm 0,86$	$9,17 \pm 1,42$
Acetyl-Carnitin				
($\mu\text{mol/l}$)	$1,05 \pm 0,21$	$1,05 \pm 0,07$	$0,88 \pm 0,23$	$1,02 \pm 0,10$
γ-Butyrobetain				
($\mu\text{mol/l}$)	$0,91 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,25$	$1,10 \pm 0,05^*$	$0,76 \pm 0,13^*$
Trimethyllysin				
($\mu\text{mol/l}$)	$3,48 \pm 0,53$	$3,54 \pm 0,49$	$3,46 \pm 0,33$	$3,65 \pm 0,41$

Werte angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung (n=10/Gruppe). * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$).

5. 2. 4. 3 Aktivität der Glutathionperoxidase im Plasma

Der antioxidative Status des Plasmas wurde über die Aktivität der Glutathionperoxidase (GPX) bestimmt. Die Aktivität der GPX ergab in allen Behandlungsgruppen signifikant höhere Werte als in der Kontrollgruppe ($P < 0,05$). Untereinander zeigten die Behandlungsgruppen keine Unterschiede (Kontrollgruppe $371 \pm 16,3 \text{ U/l}$, Fischölgruppe $459 \pm 29,5 \text{ U/l}^*$, Clofibratgruppe $467 \pm 31,3 \text{ U/l}^*$, Energierestriktionsgruppe $449 \pm 42,7 \text{ U/l}^*$; * = $P < 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

5. 2. 5 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

5. 2. 5. 1 Relative mRNA-Konzentrationen von Zielgene des PPAR α in der Leber und Muskulatur und Fettgewebe

Zu den analysierten Genen in der Leber zählten Gene der Fettsäureaufnahme und β -Oxidation. Hierzu gehörten *Solute Carrier Family 27A1 (SLC27A1)*, *Fatty Acid Binding Protein 1 (FABP1)*, Carnitin-Palitleyltransferase (*CPT1A*) und CD36 Molekül (*CD36*), *Acyl-CoA Oxidase 1 (ACOX1)*, Cytochrom P450 4A24 (*CYP4A24*) und Lipoproteinlipase (*LPL*). Zusätzlich wurde in der Muskulatur das *Uncoupling Protein 3 (UCP3)* und anstelle von *FABP1* und *CPT1A* die muskelspezifischen Varianten *FABP3* und *CPT1B* gemessen. Im Fettgewebe erfolgten ebenfalls Messungen oben genannter Gene gegebenenfalls mit der gewebespezifischen Variante. Des Weiteren erfolgte in der Leber die Messung des *Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21)*.

In der Leber zeigte die Fischölgruppe bezüglich der untersuchten Gene in ihren relativen mRNA-Konzentrationen keine nennenswerten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 37).

In der Clofibratgruppe war eine Erhöhung der relativen mRNA-Konzentration von *CPT1A* und *FGF21* zu beobachten ($P < 0,05$, Tab. 37). Die relative mRNA-Konzentration von *CYP4A24* zeigte eine tendenzielle Erhöhung ($P < 0,1$).

In der restriktiv gefütterten Gruppe war die relative mRNA-Konzentration von *SLC27A1* gegenüber der Kontrollgruppe leicht vermindert ($P = 0,05$).

Tabelle 37: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Zielgenen in der Leber

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>ACOX1</i>	1 \pm 0,61	0,59 \pm 0,28	1,16 \pm 0,65	0,57 \pm 0,43
<i>CD36</i>	1 \pm 0,38	0,88 \pm 0,29	0,91 \pm 0,39	1,11 \pm 0,57
<i>CPT1A</i>	1 \pm 0,75	0,78 \pm 0,36	3,86 \pm 1,77*	0,78 \pm 0,31
<i>CYP4A24</i>	1 \pm 0,47	1,16 \pm 0,37	1,53 \pm 0,62 [#]	0,76 \pm 0,25
<i>FABP1</i>	1 \pm 0,36	0,70 \pm 0,20*	1,32 \pm 0,42	0,80 \pm 0,42
<i>FGF21</i>	1 \pm 0,80	1,41 \pm 1,32	8,77 \pm 1,78*	0,93 \pm 0,45
<i>LPL</i>	1 \pm 0,49	1,64 \pm 0,78	1,48 \pm 0,48	1,69 \pm 1,17
<i>SLC27A1</i>	1 \pm 0,47	0,71 \pm 0,17	0,96 \pm 0,14	0,62 \pm 0,21*

Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$), # = Tendenziell signifikant ($P \leq 0,1$).

Abkürzungen: *ACOX1* Acyl-CoA oxidase 1; *CD36* CD36 molecule; *CPT1A* Carnitine palmitoyltransferase 1A (liver); *CYP4A24* Cytochrome P450 4A24; *FABP1* Fatty acid binding protein 1; *FGF21* Fibroblast growth factor 21; *LPL* Lipoprotein lipase; *SLC27A1* Solute carrier familiy 27A1.

In der Muskulatur zeigte die Fischölgruppe erhöhte Werte der mRNA-Konzentrationen von *CD36* und *FABP3* ($P < 0,05$; Tab. 38). Die relative mRNA-Konzentration von *FATP* zeigte einen leicht erniedrigten Wert.

In der Clofibratgruppe waren die relativen mRNA-Konzentrationen von *ACOX1*, *CD36*, *CPT1*, *CYP4A24* und *LPL* erhöht ($P < 0,05$).

In der Gruppe der Energierestriktion wiesen lediglich *CD36* und *ACOX1* höhere relative mRNA-Konzentrationen auf. Ergebnisse sind in Tabelle 38 dargestellt.

Tabelle 38: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Zielgenen in der Muskulatur

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>ACOX1</i>	1 \pm 0,36	1,28 \pm 0,55	1,62 \pm 0,38*	1,49 \pm 0,39*
<i>CD36</i>	1 \pm 0,16	1,26 \pm 0,29*	1,43 \pm 0,16*	1,44 \pm 0,11*
<i>CPT1B</i>	1 \pm 0,37	1,42 \pm 0,62	1,64 \pm 0,53*	1,13 \pm 0,60
<i>CYP4A24</i>	1 \pm 0,38	1,23 \pm 0,12	1,52 \pm 0,31*	1,06 \pm 0,29
<i>FABP3</i>	1 \pm 0,24	1,97 \pm 0,80*	1,27 \pm 0,35	1,31 \pm 0,45
<i>LPL</i>	1 \pm 0,51	1,12 \pm 0,31	1,68 \pm 0,48*	1,02 \pm 0,33
<i>SLC27A1</i>	1 \pm 0,10	0,84 \pm 0,15*	1,12 \pm 0,14	0,97 \pm 0,16
<i>UCP3</i>	1 \pm 0,32	1,31 \pm 0,63	1,16 \pm 0,20	1,79 \pm 1,33

Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (P < 0,05).

Abkürzungen: *ACOX1* Acyl-CoA oxidase 1; *CD36* CD36 molecule; *CPT1B* Carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle); *CYP4A24* Cytochrome P450 4A24; *FABP3* Fatty acid binding protein 3; *LPL* Lipoprotein lipase; *SLC27A1* Solute carrier family 27A1; *UCP3* Uncoupling protein 3.

Im Fettgewebe waren die relativen mRNA-Konzentrationen von *FABP4* und *LPL* in der Fischölgruppe erniedrigt (P < 0,05, Tab. 39).

Die Clofibratgruppe zeigte signifikant verminderte mRNA-Konzentrationen bei *CYP4A24*, *CPT1* und *LPL*.

Die restriktiv gefütterte Gruppe wies gleichermaßen verminderte relative mRNA-Konzentrationen von *CD36*, *FABP4* und *LPL* auf (P < 0,05, Tab. 39).

Tabelle 39: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Zielgenen im weißen Fettgewebe

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>ACOX1</i>	1 \pm 0,20	0,77 \pm 0,44	0,78 \pm 0,58	0,73 \pm 0,50
<i>CD36</i>	1 \pm 0,32	0,70 \pm 0,49	0,68 \pm 0,50	0,56 \pm 0,27*
<i>CPT1</i>	1 \pm 0,59	0,74 \pm 0,17	0,30 \pm 0,24*	0,63 \pm 0,29
<i>CYP4A24</i>	1 \pm 0,96	0,68 \pm 0,34	0,24 \pm 0,09*	0,52 \pm 0,38
<i>FABP4</i>	1 \pm 0,43	0,63 \pm 0,33*	0,66 \pm 0,42	0,65 \pm 0,27*
<i>LPL</i>	1 \pm 0,29	0,51 \pm 0,18*	0,52 \pm 0,27*	0,65 \pm 0,38*

Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (P < 0,05).

Abkürzungen: *ACOX1* Acyl-CoA Oxidase 1; *CD36* CD36 molecule; *CPT1* Carnitine palmitoyltransferase 1; *CYP4A24* Cytochrome P450 4A24; *FABP4* Fatty acid binding Protein 4; *LPL* Lipoprotein lipase.

5. 2. 5. 2 Relative mRNA-Konzentrationen von Genen der Carnitinaufnahme und -synthese in der Leber

Die Untersuchung der an der Synthese von Carnitin und dessen Aufnahme in die Zelle beteiligten Gene führte zu unterschiedlichen Ergebnissen unter den Gruppen. Berücksichtigt wurden Transporter *SLC22A5*, sowie die zur Synthese von Carnitin notwendigen Gene *ALDH9A1*, *TMLHE* und *BBOX1* (siehe Tab. 40).

Die Fischölgruppe zeigte keine Veränderungen in der Expression dieser Gene.

In der Clofibratgruppe waren die relativen mRNA-Konzentrationen von *SLC22A5* und *TMLHE* gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (P < 0,05; Tab. 40).

In der restriktiv gefütterten Gruppe zeigten die Gene für *ALDH9A1*, *BBOX1* und *SLC22A5* signifikant verminderte relative mRNA-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (P < 0,05; Tab. 40).

Tabelle 40: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Genen der Carnitinaufnahme und -synthese in der Leber

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>ALDH9A1</i>	1 ± 0,55	0,57 ± 0,14	0,90 ± 0,21	0,39 ± 0,17*
<i>BBOX1</i>	1 ± 0,56	0,69 ± 0,41	0,57 ± 0,15	0,41 ± 0,23*
<i>SLC22A5</i>	1 ± 0,26	1,05 ± 0,39	1,87 ± 0,24*	0,52 ± 0,19*
<i>TMLHE</i>	1 ± 0,26	1,05 ± 0,13	1,62 ± 0,63*	0,91 ± 0,45

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (P < 0,05).

Abkürzungen: *ALDH9A1* Aldehyde dehydrogenase 9A1; *BBOX1* Butyrobetaine (γ), 2-oxoglutarate dioxygenase (gamma-butyrobetaine hydroxylase) 1; *SLC22A5* Solute carrier family 22A5; *TMLHE* Trimethyllysine hydroxylase, epsilon.

5. 2. 5. 3 Relative mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des NF-κB in der Leber und Muskulatur

Zur Untersuchung der Auswirkungen auf den NF-κB-Signalweg wurden als Zielgene die Cytokine Interleukin 1β (*IL1B*) und Tumornekrosefaktor (*TNF*), die Chemokine Interleukin 8 (*IL8*) und *Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (CCL2)*, die Akute-Phase-Proteine Serum Amyloid A2 (*SAA2*) und Haptoglobin (*HP*), das Adhäsionsmolekül *Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM1)*, das Lipopolysaccharid bindende Protein (*LBP*) und aus der Reihe der Gene der Stressantwort die *Prostaglandin-endoperoxide Synthase 2 (PTGS2)* gemessen.

Im Lebergewebe zeigten die Sauen der Fischölgruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigte mRNA-Konzentrationen an *ICAM1* und *LBP* (P < 0,05; Tab. 41). Die relative mRNA-Konzentration von *HP* zeigte einen tendenziell erniedrigten Wert (P < 0,1).

In der Clofibratgruppe konnten ebenfalls erniedrigte Werte der mRNA-Konzentrationen einiger Zielgene festgestellt werden, jedoch war davon nur die von *SAA2* signifikant erniedrigt (P < 0,05; Tab. 41). Die relativen mRNA-Konzentrationen von *IL8* und *LBP* waren nur tendenziell erniedrigt (P ≤ 0,1). Im Gegensatz dazu zeigte *CCL2* eine erhöhte Konzentration um 1,8-fache (P < 0,05).

In der restriktiv gefütterten Gruppe waren fünf der gemessenen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des NF-κBs gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt (Tab. 41). Hier zeigten die mRNA-Konzentrationen von *ICAM1*, *SAA2*, *IL1B*, *HP* und *LBP* verminderte Werte im

Vergleich zur Kontrollgruppe. Einen Überblick über diese Ergebnisse ist in Tabelle 41 gegeben.

Tabelle 41: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des NF-κB in der Leber

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>CCL2</i>	1 ± 0,22	0,88 ± 0,21	1,87 ± 0,48*	0,76 ± 0,26
<i>HP</i>	1 ± 0,49	0,55 ± 0,19 [#]	0,79 ± 0,18	0,41 ± 0,13*
<i>ICAM1</i>	1 ± 0,28	0,69 ± 0,15*	0,94 ± 0,24	0,55 ± 0,18*
<i>IL1B</i>	1 ± 0,50	0,87 ± 0,44	0,77 ± 0,21	0,41 ± 0,23*
<i>IL8</i>	1 ± 0,56	0,73 ± 0,33	0,42 ± 0,12 [#]	1,09 ± 0,76
<i>LBP</i>	1 ± 0,61	0,21 ± 0,07*	0,44 ± 0,22 [#]	0,28 ± 0,23*
<i>PTGS2</i>	1 ± 0,40	1,23 ± 0,43	1,22 ± 0,24	1,05 ± 0,53
<i>SAA2</i>	1 ± 0,39	0,75 ± 0,34	0,56 ± 0,24*	0,45 ± 0,21*
<i>TNF</i>	1 ± 0,15	0,90 ± 0,21	1,00 ± 0,31	1,52 ± 0,87

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$), # = Tendenziell signifikant ($P \leq 0,1$).

Abkürzungen: *CCL2* Chemokine (C-C motif) ligand 2; *HP* Haptoglobin; *ICAM1* Intercellular adhesion molecule-1; *IL1B* Interleukin 1β; *IL8* Interleukin 8; *LBP* Lipopolysaccharide binding protein; *PTGS2* Prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase (prostaglandin-endoperoxide synthase 2); *SAA2* Serum amyloid A2; *TNF* Tumor nekrosis faktor.

In der Muskulatur konnte in der Fischöl- und Energierestriktionsgruppe keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrolle bezüglich der relativen mRNA-Konzentrationen der NF-κB-Ziele gezeigt werden (Tab. 42).

In der Clofibratgruppe zeigte nur *IL1B* eine höhere relative mRNA-Konzentration als die Kontrolle ($P < 0,05$), alle weiteren mRNA-Konzentrationen blieben statistisch unbeeinflusst (Tab 42).

Tabelle 42: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des NF- κ B in der Muskulatur

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>CCL2</i>	1 \pm 0,45	1,03 \pm 0,24	1,09 \pm 0,23	1,17 \pm 0,46
<i>IL1B</i>	1 \pm 0,36	1,32 \pm 0,35	1,47 \pm 0,20*	1,11 \pm 0,41
<i>PTGS2</i>	1 \pm 0,40	0,81 \pm 0,12	1,08 \pm 0,29	0,94 \pm 0,18
<i>TNF</i>	1 \pm 0,31	0,73 \pm 0,22	0,98 \pm 0,29	0,96 \pm 0,38

Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (P < 0,05).

Abkürzungen: *CCL2* Chemokine (C-C motif) ligand 2; *IL1B* Interleukin 1 β ; *PTGS2* Prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase (prostaglandin-endoperoxide synthase 2); *TNF* Tumor nekrosis faktor.

5. 2. 5. 4 Relative mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des Nrf2 in der Leber und Muskulatur

Zur Überprüfung des antioxidativen Abwehrgeschehens auf Ebene des Transkriptoms wurden Zielgene des Nrf2 in den Geweben von Leber und quergestreifter Muskulatur untersucht. Zu den untersuchten Zielgenen zählte Cytochrom P450 1A1 (*CYP1A1*), Gluthathionperoxidase 1 (*GPX1*), Hämoxigenase 1 (*HMOX1*), *NAD(P)H-Dehydrogenase, quinone 1* (*NQO1*), Peroxiredoxin 6 (*PRDX6*), Superoxiddismutase 1 (*SOD1*) und Thioredoxinreduktase 1 (*TXNRD-1*).

In der Leber der Fischölgruppe wies nur *PRDX6* eine signifikant niedrigere relative mRNA-Konzentration als die Kontrollgruppe auf (P < 0,05; Tab. 43). Die relative mRNA-Konzentration von *GPX-1* war nur tendenziell niedriger als die der Kontrolle (P < 0,1; Tab 43).

In der Clofibratgruppe war nur bei *PRDX6* eine signifikant verminderte mRNA-Konzentration zur Kontrollgruppe zu beobachten.

Die Gruppe der Energierestriktion zeigte den größten Effekt. In dieser Gruppe waren die relativen mRNA-Konzentrationen von *GPX1*, *HMOX1*, *NQO1*, *SOD* und *PRDX6* im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert (P < 0,05; Tab. 43).

Tabelle 43: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des Nrf2 in der Leber

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>CYP1A1</i>	1 ± 0,80	0,69 ± 0,26	1,47 ± 0,70	1,51 ± 0,47
<i>GPXI</i>	1 ± 0,33	0,73 ± 0,22 [#]	1,13 ± 0,28	0,62 ± 0,18*
<i>HMOX1</i>	1 ± 0,61	0,64 ± 0,29	0,58 ± 0,14	0,34 ± 0,05*
<i>NQO1</i>	1 ± 0,22	0,99 ± 0,37	1,03 ± 0,35	0,47 ± 0,18*
<i>PRDX6</i>	1 ± 0,56	0,53 ± 0,21*	0,46 ± 0,12*	0,34 ± 0,17*
<i>SOD1</i>	1 ± 0,52	0,66 ± 0,27	1,14 ± 0,31	0,33 ± 0,12*
<i>TXNRD1</i>	1 ± 0,50	0,98 ± 0,23	0,95 ± 0,14	0,65 ± 0,10

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$), # = Tendenziell signifikant ($P \leq 0,1$).

Abkürzungen: *CYP1A1*) Cytochrome P450 1A1; *GPXI* Glutathione peroxidase 1; *HMOX1* Heme oxygenase (decycling) 1; *NQO1* NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1; *PRDX6* Peroxiredoxin 6; *SOD1* Superoxide dismutase 1; *TXNRD1* Thioredoxin reductase 1.

In der Muskulatur der Fischölgruppe zeigte die *GPXI* eine erhöhte relative mRNA-Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe ($P < 0,05$; Tab. 44). *HMOX1* wies jedoch eine geringere relative mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe auf ($P < 0,05$; Tab. 44).

In der Gruppe mit Clofibratzulage waren die relativen mRNA-Konzentrationen der Nrf2-Zielgene mit Ausnahme der *SOD* und *NQO1* gegenüber der Kontrolle vermehrt exprimiert (Tab. 44). Die mRNA-Konzentration von *SOD* zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant niedrigere Konzentration ($P < 0,05$).

In der restriktiv gefütterten Gruppe konnte gleichermaßen bei *GPXI*, *PRDX6* und *HMOX1* eine erhöhte relative mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden ($P < 0,05$). Tabelle 44 zeigt die gemessenen relativen mRNA-Konzentrationen der qPCR-Analyse.

Tabelle 44: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des Nrf2 in der Muskulatur

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>CYP1A1</i>	1 ± 0,41	1,58 ± 0,73	2,99 ± 1,21*	1,35 ± 0,53
<i>GPX1</i>	1 ± 0,39	2,11 ± 0,64*	2,38 ± 0,72*	1,95 ± 0,17*
<i>HMOX1</i>	1 ± 0,26	0,68 ± 0,10*	1,49 ± 0,34*	1,40 ± 0,21*
<i>NQO1</i>	1 ± 0,24	1,25 ± 0,60	1,53 ± 0,70	0,99 ± 0,33
<i>PRDX6</i>	1 ± 0,35	1,04 ± 0,25	1,38 ± 0,16*	1,39 ± 0,25*
<i>SOD1</i>	1 ± 0,07	0,97 ± 0,13	0,85 ± 0,05*	1,07 ± 0,23
<i>TXNRD1</i>	1 ± 0,14	1,09 ± 0,38	1,44 ± 0,38*	1,33 ± 0,58

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (P < 0,05).

Abkürzungen: *CYP1A1*) Cytochrome P450 1A1; *GPX1* Glutathione peroxidase 1; *HMOX1* Heme oxygenase (decycling) 1; *NQO1* NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1; *PRDX6* Peroxiredoxin 6; *SOD1* Superoxide dismutase 1; *TXNRD1* Thioredoxin reductase 1.

5. 2. 5. 5 Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR in der Leber und Muskulatur

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer PPAR α -Aktivierung auf die UPR wurden die gleichen Gene, die auch zur Untersuchung im ersten Teilversuch (siehe 5.1.1.2) dienten, analysiert.

Im Lebergewebe der Fischölgruppe waren die relativen mRNA-Konzentrationen von vier UPR-Zielgenen (*DNAJC3*, *GRP94*, *BCL2*, *DDIT3*) im Vergleich zur Kontrolle verringert (P < 0,05; Tab. 45).

In der Gruppe mit Clofibratzulage blieben die relativen mRNA-Konzentrationen aller gemessenen Gene unbeeinflusst.

In der restriktiv gefütterten Gruppe waren die größten Effekte zu sehen. Hier zeigten zwölf der 14 gemessenen Gene geringere relative mRNA-Konzentrationen als die Kontrollgruppe (P < 0,05; Tab. 45). Die Ergebnisse sind in Tabelle 45 dargestellt.

Tabelle 45: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR in der Leber

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>ATF4</i>	1 ± 0,54	0,86 ± 0,50	1,03 ± 0,38	0,45 ± 0,20*
<i>BAK1</i>	1 ± 0,57	0,75 ± 0,18	0,86 ± 0,29	0,55 ± 0,29
<i>BAX</i>	1 ± 0,19	0,88 ± 0,25	1,25 ± 0,55	0,44 ± 0,10*
<i>BCL2</i>	1 ± 0,37	0,69 ± 0,17*	0,94 ± 0,22	0,52 ± 0,14*
<i>CASP3</i>	1 ± 0,39	0,91 ± 0,31	0,89 ± 0,28	0,50 ± 0,11*
<i>CASP8</i>	1 ± 0,36	0,76 ± 0,26	0,94 ± 0,18	0,57 ± 0,23*
<i>DDIT3</i>	1 ± 0,28	0,73 ± 0,33*	0,87 ± 0,21	0,51 ± 0,19*
<i>DNAJC3</i>	1 ± 0,47	0,57 ± 0,16*	0,70 ± 0,22	0,46 ± 0,12*
<i>EDEMI</i>	1 ± 0,37	0,80 ± 0,21	0,82 ± 0,08	0,67 ± 0,24*
<i>HSP90B1</i>	1 ± 0,69	0,42 ± 0,18*	0,71 ± 0,35	0,28 ± 0,07*
<i>HSPA5</i>	1 ± 0,49	0,66 ± 0,21	0,84 ± 0,30	0,57 ± 0,13*
<i>PDIA4</i>	1 ± 0,38	0,93 ± 0,18	1,47 ± 0,67	0,66 ± 0,16
<i>PPP1R15A</i>	1 ± 0,43	0,72 ± 0,25	0,78 ± 0,15	0,54 ± 0,16*
<i>TP53</i>	1 ± 0,23	0,78 ± 0,16	0,94 ± 0,20	0,71 ± 0,22*

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$).

Abkürzungen: *ATF4* Activating transcription factor 4; *BAK1* BCL2-antagonist/killer 1; *BAX* BCL2-associated X protein; *BCL2* B-cell CLL/lymphoma 2; *CASP3* Caspase 3; *CASP8* Caspase 8; *DDIT3* DNA-damage-inducible transcript 3; *DNAJC3* DnaJ homolog, subfamily C, member 3; *EDEMI* ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-1; *HSP90B1* Heat shock protein 90kDa beta, member 1; *HSPA5* Heat shock 70kDa protein A5; *PDIA4* Protein disulfide isomerase A4; *PPP1R15A* Protein phosphatase 1 15A; *TP53* Tumor protein 53.

In der Muskulatur der Clofibrat- und Energierestriktionsgruppe konnten entgegengesetzte Effekte beobachtet werden (Tab. 46). Die Fischölgruppe blieb im Vergleich zur Kontrolle in ihren relativen mRNA-Konzentrationen unbeeinflusst (Tab. 46).

In der Gruppe mit Clofibratzulage zeigten *PDIA4*, *EDEMI*, *DDIT3* und *HSP90B1* erhöhte relative mRNA-Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe ($P < 0,05$).

In der restriktiv gefütterte Gruppe konnten erhöhte relative mRNA-Konzentrationen bei *DNAJC3*, *BAX*, *HSP90B1* und *TP53* im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden ($P < 0,05$; Tab. 46).

Tabelle 46: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR in der Muskulatur

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>ATF4</i>	1 ± 0,30	0,91 ± 0,45	1,27 ± 0,29	1,10 ± 0,25
<i>BAX</i>	1 ± 0,60	1,00 ± 0,33	1,22 ± 0,40	1,52 ± 0,41*
<i>BCL2</i>	1 ± 0,30	1,12 ± 0,30	1,10 ± 0,26	0,96 ± 0,41
<i>CASP3</i>	1 ± 0,27	0,91 ± 0,30	0,95 ± 0,26	1,09 ± 0,46
<i>CASP8</i>	1 ± 0,15	1,17 ± 0,36	1,13 ± 0,25	1,02 ± 0,38
<i>DDIT3</i>	1 ± 0,22	1,11 ± 0,33	1,42 ± 0,29*	1,17 ± 0,46
<i>DNAJC3</i>	1 ± 0,23	0,91 ± 0,29	1,12 ± 0,20	1,34 ± 0,36*
<i>EDEMI</i>	1 ± 0,32	1,23 ± 0,43	1,64 ± 0,38*	1,69 ± 0,72
<i>HSP90B1</i>	1 ± 0,34	0,91 ± 0,26	1,44 ± 0,22*	1,53 ± 0,43*
<i>HSPA5</i>	1 ± 0,31	0,92 ± 0,40	1,16 ± 0,33	1,06 ± 0,50
<i>PDIA4</i>	1 ± 0,59	1,00 ± 0,19	1,61 ± 0,46*	1,51 ± 0,49
<i>PPP1R15A</i>	1 ± 0,43	1,05 ± 0,27	1,24 ± 0,25	1,17 ± 0,39
<i>TP53</i>	1 ± 0,41	1,09 ± 0,27	1,25 ± 0,31	1,55 ± 0,55*

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (P < 0,05).

Abkürzungen: *ATF4* Activating transcription factor 4; *BAX* BCL2-associated X protein; *BCL2* B-cell CLL/lymphoma 2; *CASP3* Caspase 3; *CASP8* Caspase 8; *DDIT3* DNA-damage-inducible transcript 3; *DNAJC3* DnaJ homolog, subfamily C, member 3; *EDEMI* ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-1; *HSP90B1* Heat shock protein 90kDa beta, member 1; *HSPA5* Heat shock 70kDa protein A5; *PDIA4* Protein disulfide isomerase A4; *PPP1R15A* Protein phosphatase 1 15A; *TP53* Tumor protein 53.

5. 2. 5. 6 Relative mRNA-Konzentrationen der SREBPs und zugehöriger Zielgene in der Leber

Die in Tabelle 47 dargestellten Ergebnisse der relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ausgewählter Zielgene ergaben kein einheitliches Bild.

Bei der Fischölgruppe blieben die relativen mRNA-Konzentrationen von *SREBF2* und dessen Zielgene (*MVK*, *LDLR*, *HMGCR*) im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Tab 47). Die relativen mRNA-Konzentrationen von *SREBF1* und den Zielgenen *GPAT* und *SCD* waren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert (P < 0,05). Bei *ACACA* war die relative mRNA-Konzentration zur Kontrolle tendenziell verringert (P ≤ 0,1).

Bei der restriktiv gefütterten Gruppe konnten verminderte relative mRNA-Konzentrationen von *MVK*, *LDLR*, *ACACA*, *GPAT* und *FASN* ($P < 0,05$; Tab. 47) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

Dem gegenüber zeigte die Clofibratgruppe höhere mRNA-Konzentrationen von *MVK*, *LDLR* und *SCD* als die Kontrolle ($P < 0,05$).

Tabelle 47: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und zugehöriger Zielgene in der Leber

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>SREBF1</i>	1 ± 0,50	0,45 ± 0,23*	0,71 ± 0,10	1,02 ± 0,33
<i>ACACA</i>	1 ± 0,16	0,73 ± 0,36 [#]	0,96 ± 0,39	0,37 ± 0,14*
<i>FASN</i>	1 ± 0,71	0,45 ± 0,30	0,44 ± 0,16	0,25 ± 0,12*
<i>GPAT</i>	1 ± 0,15	0,68 ± 0,07*	0,97 ± 0,35	0,57 ± 0,16*
<i>SCD</i>	1 ± 0,47	0,50 ± 0,28*	2,37 ± 1,07*	0,69 ± 0,30
<i>SREBF2</i>	1 ± 0,29	1,10 ± 0,18	1,17 ± 0,10	0,79 ± 0,18*
<i>HMGCR</i>	1 ± 0,76	1,18 ± 0,68	1,52 ± 0,74	0,42 ± 0,23
<i>LDLR</i>	1 ± 0,17	1,10 ± 0,22	1,36 ± 0,10*	0,49 ± 0,19*
<i>MVK</i>	1 ± 0,40	0,91 ± 0,20	1,51 ± 0,27*	0,59 ± 0,21*

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$), # = Tendenziell signifikant ($P \leq 0,1$).

Abkürzungen: *ACACA* Acetyl-CoA carboxylase α ; *FASN* Fatty acid synthase; *GPAT* Glycerol-3-phosphat-acyltransferase; *HMGCR* 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; *LDLR* Low density lipoprotein receptor; *MVK* Mevalonate kinase; *SCD* Stearoyl-CoA desaturase; *SREBF1* Sterol regulatory element binding transcription factor 1; *SREBF2* Sterol regulatory element binding transcription factor 2.

5. 2. 5. 7 Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des UPS in der Muskulatur

Unter den untersuchten Genen des UPS (siehe 5.1.1.1) zeigten in der Fischölgruppe *FBXO32* und *TRIM63* in einen Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte relative mRNA-Konzentration ($P < 0,05$; Tab 48).

Die Clofibratgruppe wies bei *TRIM63*, *FBXO32* und *UBB* erhöhte relative mRNA-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle auf ($P < 0,05$; Tab 48).

In der Gruppe der Energierestriktion war eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Konzentration von *FBXO32* gegenüber der Kontrollgruppe zu beobachten. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 48.

Tabelle 48: Auswirkungen der vorgenommenen Behandlungen in der Laktation auf die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des UPS in der Muskulatur

Gen	Kontrolle	Fischöl	Clofibrat	Energierestriktion
<i>FBXO32</i>	1 ± 0,64	2,00 ± 0,38*	1,98 ± 0,80*	3,12 ± 2,06*
<i>PSMA1</i>	1 ± 0,22	0,80 ± 0,17	0,85 ± 0,13	0,83 ± 0,43
<i>PSMB1</i>	1 ± 0,15	0,94 ± 0,29	1,08 ± 0,20	1,00 ± 0,26
<i>TRIM63</i>	1 ± 0,45	1,78 ± 0,81*	2,71 ± 0,97*	1,84 ± 1,08
<i>UBB</i>	1 ± 0,23	1,21 ± 0,09	1,28 ± 0,12*	1,12 ± 0,11
<i>UBE2B</i>	1 ± 0,11	0,90 ± 0,30	1,09 ± 0,21	1,02 ± 0,35

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung (n=10/Gruppe) als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (P < 0,05).

Abkürzungen: *FBXO32* F-box protein 32; *PSMA1* Proteasome subunit, alpha type-1; *PSMB1* Proteasome subunit, beta type-1; *TRIM63* Tripartite motif containing 63; *UBB* Ubiquitin B; *UBE2B* Ubiquitin-conjugating enzyme E2B.

6 Diskussion

Über die Wirkung des PPAR α während der Laktation bei Sauen ist bisher wenig bekannt. Studien der eigenen Arbeitsgruppe befassten sich bereits mit den Veränderungen des Intermediärstoffwechsels über den PPAR α bei der laktierenden Sau (Rosenbaum *et al.*, 2012a, 2012b). In der vorliegenden Arbeit sollten im ersten Versuch, weiterführend zu obig genannten Studien, die Auswirkungen der Laktation auf den Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsels und die Proteolyse in der quergestreiften Muskulatur auf Genexpressionsebene untersucht werden. Neben den Ergebnissen zum Intermediärstoffwechsel konnte in der eigenen Arbeitsgruppe auch Hinweise auf eine laktationsbedingte Entzündungsreaktion in der Leber beobachtet werden (Rosenbaum *et al.* 2012a). Diesbezüglich wurden auch Untersuchungen zur Wirkung der Laktation auf die UPR als Antwort auf vermehrt auftretenden ER-Stress angestellt, da eine Entzündungsreaktion meist mit einem Auftreten von ER-Stress einhergeht (Kaufmann, 1999; Todd *et al.*, 2008).

In einem zweiten Versuch sollte überprüft werden, ob durch Zufuhr von Fischöl und Clofibrat und einer Reduktion der Energiezufuhr um 25% des Bedarfs eine Aktivierung des PPAR α als wichtiger Faktor kataboler Stoffwechselwege (Mandard *et al.* 2004) erreicht werden kann. Des Weiteren wurden Untersuchungen zu den Auswirkungen der Behandlungen mit Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Gene des Fettsäurestoffwechsels, der Lipogenese, des Cholesterinstoffwechsels und des Muskelabbaus durchgeführt. Da auch bekannt ist, dass der PPAR α in die Regulation des Entzündungsgeschehens eingreifen kann (Delerive, 2000, 2002), wurde in dieser Teilstudie Untersuchungen zu Zielgenen des NF- κ B, Nrf2 und der UPR angestellt.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse des ersten Versuchs diskutiert; im Anschluss daran folgen die Erkenntnisse der zweiten Teilstudie.

6.1 Einfluss der Laktation auf ausgewählte Stoffwechselwege

Für diese Teilstudie wurde eine Gruppe von 20 tragenden Sauen ausgewählt, die in Gruppen zu je 10 Tieren eingeteilt wurden. Nach dem Abferkeln wurde einer Gruppe die Ferkel entzogen; diese stellten im Anschluss die Milchproduktion ein. Diese Sauengruppe diente als nicht-laktierende Kontrollgruppe.

6. 1. 1 Einfluss der Laktation auf Gene des Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsels

Der Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsel wird grundlegend durch die Aktivität der SREBPs kontrolliert. In der Leber reguliert dabei SREBP-1c überwiegend die Biosynthese der Triglyceride, SREBP-2 die des Cholesterins (Shimomura *et al.*, 1997; Horton *et al.*, 2002). Diese beiden Transkriptionsfaktoren veranlassen die Expression einer Vielzahl von Genen, welche für Enzyme codieren, die umfangreichen an der Synthese von Triglyceriden und Cholesterin beteiligt sind (Horton *et al.*, 2002). Für die Untersuchungen wurden sieben repräsentative Gene ausgewählt. Hierzu zählten bei der Triglyceridbiosynthese die *ACACA*, *FASN*, *GPAT* und *SCD*, bei der Cholesterinsynthese wurden *HMGCR*, *MVK* und der *LDLR* in die Analyse einbezogen (Shimano, 2001; Horton *et al.*, 2002).

Nennenswerten Effekte konnten nicht ermittelt werden. Lediglich die relative mRNA-Konzentration von *SREBF1* wurde durch die Laktation positiv beeinflusst. In menschlichen Hepatozyten konnte eine positive Wirkung von PPAR α -Agonisten auf die Expression des SREBP-1c nachgewiesen werden (Fernandez-Alvarez *et al.*, 2011). Hier führte eine Aktivierung des PPAR α durch die Agonisten WY14643 und GW7647 zu einer Stimulation in der Promotorregion des SREBP-1c. Da der Organismus des Schweins in seiner Reaktionsweise häufig dem des Menschen ähnelt, wird es oft als entsprechendes Tiermodell ausgewählt (Sigel *et al.*, 1994; Spurlock und Gabler, 2008). Dies würde dafür sprechen, dass *SREBF1* auch bei Schweinen zu den PPAR α -Zielgenen zählen könnte und durch die laktationsbedingte Aktivierung des PPAR α simuliert werden würde. Jedoch stände dies im Gegensatz zu den Ergebnissen von Luci *et al.* (2007a). Da auch kein Anstieg der mRNA-Konzentrationen der Zielgene zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass dieser Signalweg nicht vermehrt aktiviert war.

In einer Studie von Schlegel *et al.* (2012b) konnte gezeigt werden, dass Kühe nur in der ersten Woche *post partum* eine erhöhte Cholesterinkonzentration in der Leber, zusammen mit gesteigerter Expression der Zielgene von SREBP-2 aufwiesen. Die mRNA-Konzentrationen der Zielgene fielen jedoch ab der fünften Laktationswoche stark ab, sodass vermutet wurde, dass ein vermehrter Bedarf an Cholesterin nur zu Beginn der Laktation zur vermehrten Gallensäureproduktion und Milchsynthese vorliegt (Schlegel *et al.*, 2012b). Da in der ersten Teilstudie nur am 20. Tag der Laktation Biopsieproben der Leber gewonnen wurden, konnte kein zeitlicher Verlauf der Cholesterinbiosynthese dargestellt werden. Sauen könnten ebenso zu Beginn der Laktation eine Steigerung der Cholesterinbiosynthese aufweisen, die zum

Zeitpunkt der Probengewinnung des dargelegten Versuches nicht mehr vorlag. Hierzu wären weiterreichendere Untersuchungen notwendig.

6. 1. 2 Einfluss der Laktation auf Gene des Muskelabbaus

Die Muskulatur, als körperinterner Proteinspeicherort, kann in Zeiten negativer Energiebilanz oder während schwerwiegender Krankheitszustände genutzt werden, um Proteine zur Energieversorgung zu rekrutieren (Attaix *et al.*, 2003; Tisdale, 2005). So werden die aus den Muskelproteinen freigesetzten Aminosäuren in der Leber zur Gluconeogenese und Ketogenese verwendet (Dospil *et al.*, 2005). In der Phase der Laktation werden Proteine zusätzlich zur Energiegewinnung auch zur Bildung des Milcheiweißes in der Milchdrüse benötigt (Spincer *et al.*, 1969).

In einer Studie zu laktationsbedingten Veränderungen bei der Sau konnte gezeigt werden, dass zu dieser Zeit der Aminosäurestoffwechsel in der Leber zu Gunsten der Glukoneogenese erhöht ist. Des Weiteren wurde eine Einsparung von Alanin beobachtet, was vermuten ließ, dass dieses zur Versorgung der Milchdrüse genutzt werden könnte (Rosenbaum *et al.*, 2012a). Um nähere Erkenntnisse zu Proteinabbau in der Muskulatur zu erhalten, wurden in der ersten Teilstudie Muskelbiopsien zur Untersuchung der Gene des Proteinabbaus herangezogen. Hierbei lagen Biopsien zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation vor (Tag 10 und Tag 20). Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass zwischen der Kontrollgruppe und der laktierenden Gruppe zum Zeitpunkt der ersten Biopsie keine Unterschiede bezüglich der Expression von Genen des UPS vorlagen. Auch zeigte die Kontrollgruppe zum zweiten Entnahmezeitpunkt keine Veränderungen gegenüber der ersten Probenentnahme auf. Dies lässt vermuten, dass während der Laktation zu Beginn noch kein erhöhter Abbau an Muskelprotein vorliegt. Clowes *et al.* (2005) beschrieben zum ersten Mal die Entwicklung des Proteinmetabolismus in der Muskulatur bei tragenden und laktierenden Sauen und konnten zeigen, dass die Proteolyse nach der Geburt bis zum Ende der Laktation stetig ansteigt. Mit dem Wachstum der Ferkel steigt auch der Proteinbedarf in der Milchdrüse, sodass bei maximaler Futteraufnahme die Muskulatur stärker als Proteinlieferant dienen muss (Clowes *et al.*, 2005). Dies könnte den schwachen Anstieg von *UBE2B*, *PSMA1*, *PSMB1* und *UBB* zum zweiten Entnahmezeitpunkt gegenüber der Kontrollgruppe und der ersten Biopsieentnahme erklären. Des Weiteren könnte es auch damit zusammenhängen, dass bei den Kontrolltieren zwar keine Laktation durch das direkte Absetzen der Ferkel auftrat, jedoch auch bei diesen Tieren der Trächtigkeitsanabolismus zurückgebildet wurde. Da jedoch die mRNA-

Konzentrationen der beiden essentiellen Gene FBXO32 und TRIM63 des Proteinabbaus in der Muskulatur (Bodine *et al.*, 2001) gegenüber der Kontrollgruppe nicht verändert waren, lässt dies vermuten, dass wahrscheinlich keine Steigerung der Proteolyse in der quergestreiften Muskulatur zu beiden Zeitpunkten der Laktation vorlag.

6. 1. 3 Einfluss der Laktation auf Gene der UPR

Anhand von Daten der *microarray*-Technologie wurde von Rosenbaum *et al.* (2012a) die Vermutung aufgestellt, dass es während der Laktation bei Sauen vermehrt zu einer Induktion der UPR aufgrund von ER-Stress kommt. Vermehrt auftretender ER-Stress mit einer Aktivierung der UPR wurde bereits bei Kühen während der Laktation beschrieben (Morris *et al.*, 2009, Geßner *et al.*, 2014). Die Ursachen von ER-Stress sind vielseitig. Störungen der ER-Funktion infolge Veränderungen im Ca^{2+} -Haushalt, des Redoxstatus und Nährstoffunterversorgung werden in diesem Zusammenhang genannt (Shen *et al.*, 2004). Auch verschiedenste Krankheitsbilder, Entzündungsreaktionen, Veränderungen im Cholesterin- und Lipidmetabolismus und Toxine können das Auftreten von ER-Stress bedingen (Kaufman, 1999; Todd *et al.*, 2008; Cnop *et al.*, 2012; Hetz, 2012). Grundlegend ist jedoch immer der Verlust eines Gleichgewichts zwischen Proteinaufkommen und der Faltungskapazität als Auslöser des ER-Stresses anzusehen und wird in der Zelle durch Einleitung der UPR bekämpft (Kaufman, 1999; Schröder und Kaufman, 2005b; Cnop *et al.*, 2012), da bestehender ER-Stress zu einer Schädigung der Zelle führen kann (Barral *et al.*, 2004).

Um die nähere Hinweise auf eine Aktivierung UPR während der Laktation, zusätzlich zu den Daten der *microarray*-Analyse, zu erhalten, wurde im ersten Versuch Biopsieproben von Leber und Muskulatur mittels qPCR-Analyse gezielt auf ausgewählte Gene der UPR untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung liefern weitere Hinweise, dass bei der Sau während der Laktation vermehrt ER-Stress vorliegt, der eine Aktivierung der UPR hervorruft. Eine Vielzahl der mRNA-Konzentrationen der gemessenen Gene, welche an der UPR beteiligt sind, war während der Laktation vermehrt exprimiert. Darunter vor allem Gene der Foldasen, Chaperone und Proteindisulfidisomerasen, die zur Wiederherstellung des Gleichgewichts beitragen sollen. Auch zeigt *ATF4* und der in dessen Regulation stehende zentrale Faktor der ER-Stress-induzierten Apoptose *DDIT3* (Hetz, 2012) erhöhte mRNA-Konzentrationen. *DDIT3* bedingt in Fällen übermäßigen ER-Stresses die Einleitung des programmierten Zelltodes, dessen Signalkaskade vor allem über Proteine der *BCL2* (*B-Cell*

Lymphoma 2)-Familie und Caspasen (Tabas und Ron, 2011; Woehlbier und Hetz, 2011) fortgeleitet wird. Diese Proteine sind in der vorliegenden Arbeit jedoch nur im geringen Maße aktiviert, was vermuten lässt, dass der Grad des ER-Stresses nicht so stark ist, dass die Einleitung der Apoptose induziert wurde. *FGF21*, welcher interessanter Weise sowohl zu den Zielgenen des PPAR α (Badman *et al.*, 2007) als auch zu denen des *ATF4* (De Sousa-Coelho *et al.*, 2012) gezählt wird, wurde in der vorliegenden Studie analysiert. Auch hier zeigte sich eine enorme Steigerung der Expressionsrate, die sowohl auf den vorliegenden ER-Stress, als auch auf die durch Rosenbaum *et al.* (2012a) dargelegte PPAR α -Aktivierung durch die Laktation zurückzuführen sein könnte. In der Muskulatur zeigte sich ein ähnliches Bild. Durch zwei Biopsien im Abstand von 10 Tagen konnte ein zeitlicher Verlauf des ER-Stresses aufgezeigt werden. Ein moderater laktationsbedingter ER-Stress trat auch in diesem Gewebe auf, der überwiegend über den Zeitraum der Laktation bestehen blieb. Die Effekte waren hauptsächlich durch die Laktation bedingt, der Zeitpunkt der Probenentnahme spielte keine nennenswerte Rolle.

6.2 Einfluss der Behandlungen durch Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion während der Laktation

Im zweiten Versuch wurden 40 Sauen in zweiter oder dritter Parität zur Zeit der Abferkelung in Gruppen zu je zehn Tieren eingeteilt. Durch unterschiedliche Futterzusätze wie Fischöl oder Clofibrat bzw. durch Reduktion der Energiezufuhr auf 75 % des täglichen Energiebedarfs sollte eine PPAR α -Aktivierung induziert werden und die Auswirkungen dieser Behandlungen auf ausgewählte Stoffwechsel- und Signalwege untersucht werden.

6.2.1 Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf die Energiebilanz und Gewichtsentwicklung der Sauen

Die Sauen der Gruppen besaßen zu Versuchsbeginn in etwa gleiche Gewichte. Die Würfe wurden auf acht Ferkel pro Wurf standardisiert, sodass alle Sauen eine entsprechende körperliche Leistung erbrachten und einen Vergleich der Gruppen zuließ. Um eine Homogenität der Würfe zu erreichen, wurden Kümmerer durch Ferkel mit durchschnittlichem Wurfgewicht ersetzt. Somit unterschieden sich die Ferkel nicht in ihren Geburtsgewichten.

In der zweiten Teilstudie nahmen die Sauen der Kontroll-, Fischöl und Clofibratgruppe trotz ausreichender Futtervorlage nicht durchgehend die volle Menge an Futter und somit nicht genügend Energie auf, um ihren Energiebedarf zu decken. Sie befanden sich darher in

einer leicht negativen Energiebilanz, die sich aber von der der restriktiv gefütterten Gruppe signifikant unterschied. Eine unzureichende Futteraufnahme *post partum* ist bereits bekannt (Weldon *et al.*, 1994; Revell *et al.*, 1998). Coccurello *et al.* (2010) konnten zeigen, dass bei der Maus eine verminderte Futteraufnahme aus einem erhöhten zirkulierenden Fettsäurespiegel resultierte. Fettsäuren passieren dabei die Blut-Hirn-Schranke und induzieren im Gehirn ein Sättigungsgefühl (Coccurello *et al.*, 2010). Da auch bei Sauen in der Laktation erhöhte Plasmakonzentrationen freier Fettsäuren aus der Mobilisierung der Körperfettreserven zur Energiegewinnung vorliegen (Rosenbaum *et al.*, 2012a), wäre ein Fettsäure-induziertes Sättigungsgefühl eine Möglichkeit, durch die die nicht ausreichende Futteraufnahme bedingt werden könnte. Die negative Energiebilanz und die bestehende Belastung durch Energie- und Substratverbrauch zur Milchproduktion (Etienne *et al.*, 1985; Brendemuhl *et al.*, 1989; Noblet und Etienne, 1989; Noblet *et al.*, 1990) sind verantwortlich für den während der Laktation auftretenden Gewichtsverlust der Sauen. Des Weiteren ist eine Abnahme des Körpergewichts, die beim Menschen in der Stillzeit durch eine Reduktion der schwangerschaftbedingten Wassereinlagerungen hervorgerufen wird (Sadurskis *et al.*, 1988) auch bei Sauen bekannt (Zoiopoulos *et al.*, 1983). Der Abbau des Trächtigkeitsanabolismus *post partum* durch Verlust an interstitiellem Wasser und dem Verlust von Protein- und Fettreserven kann somit zusätzlich als Grund der Gewichtsreduktion in Betracht gezogen werden (Shields und Mahan, 1983).

6. 2. 2 Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Zielgene des PPAR α

Aus der Literatur ist bekannt, dass freie Fettsäuren und Fibrate als Aktivatoren des PPAR α fungieren (Escher und Wahli, 2000; Berger und Moller, 2002; Ferré, 2004; Mandard *et al.*, 2004). Neben der alimentären Zufuhr von freien Fettsäuren konnte gezeigt werden, dass auch durch den Fastenzustand eine endogene PPAR α -Aktivierung induziert werden kann, da die freigesetzten Fettsäuren aus dem Fettgewebe als Liganden am PPAR α binden und diesen aktivieren (Kersten *et al.*, 1999). Untersuchungen von Rosenbaum *et al.* (2012a, 2012b) zeigten, dass es bei Sauen während der Laktation zu einer Aktivierung des PPAR α in der Leber kommt und dieser vielfältig in den Metabolismus eingreift. In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, inwiefern sich durch natürliche oder synthetische Aktivatoren (Fischöl, Clofibrat) bzw. durch eine Energierestriktion eine Steigerung der PPAR α -Aktivierung hervorgerufen werden kann und ob sich hierdurch einzelne Signal- und Stoffwechselwege weiter beeinflussen lassen. Es konnte jedoch nur eine begrenzte Menge an

Gewebeproben in den Biopsien gewonnen werden, was die Untersuchungen auf Analysen der Genexpression beschränkte und zusätzliche Untersuchungen, wie DNA-Bindungsaktivitäten von Transkriptionsfaktoren oder translatierte Proteinmengen der untersuchten Gene nicht ermöglichte. Verschiedene Studien beschrieben jedoch, dass sich die Expression von Zielgenen des PPAR α , Nrf2, NF- κ B oder der SREBPs zusammen mit der Menge an zugehörigen translatierten Proteinen verändert und dies auf eine Aktivierung oder Hemmung der Transkriptionsfaktoren schließen lässt (Keates *et al.*, 1997; You, 2002; Goto *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2010).

Um die Auswirkungen der Behandlungen durch Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion zu bestimmen, wurden klassische PPAR α -Zielgene auf die relativen Mengen ihrer exprimierten mRNA gegenüber der Kontrollgruppe in den zur Verfügung stehenden Geweben untersucht. Bisher bekannte Zielgene sind Gene des Fettsäuretransportes, der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation und der Glukoneo- und Ketogenese (Kersten *et al.*, 1999; Mandard *et al.*, 2004; Rakhshandehroo *et al.*, 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte nur durch die Behandlung mit Clofibrat eine moderate PPAR α -Aktivierung in der Leber laktierender Sauen erreicht werden. Die Analysen zeigten, dass *SLC27A1*, *CD36* und das *FABP1*, die die Aufgabe des Transportes der Fettsäuren in die Zellen vermitteln (Rakhshandehroo *et al.*, 2010), keine signifikante transkriptionelle Veränderungen aufwiesen. Nur in der Clofibratgruppe war der Wert von *FABP* leicht erhöht, jedoch konnte durch eine starke Streuung kein statistischer Effekt und somit kein Hinweis auf einen erhöhten Fettsäuretransport in die Hepatozyten beobachtet werden. *CPT1A* katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Transport der Fettsäuren in das Mitochondrium (Berger und Moller, 2002). Diesbezüglich konnte eine vermehrte Transkriptionsrate ausschließlich in der Clofibratgruppe beobachtet werden. Die peroxisomale β -Oxidation repräsentierte das Enzym *ACOX1*, die aber in der Leber des vorliegenden Versuches keinerlei Veränderung durch die Behandlungen erfuhr. Weitere Untersuchungen von Zielgenen des PPAR α beliefen sich auf *LPL* und *CYP4A24*, wobei *LPL* die Spaltung der Triglyceride aus Lipoproteinen zur Bereitstellung freier Fettsäuren im Verlauf des Fettsäurestoffwechsel katalysiert (Mandard *et al.*, 2004) und *CYP4A24* zur ω -Hydroxylierung der Fettsäuren beiträgt (Lundell, 2002). Jedoch konnte bei *LPL* trotz erhöhter Werte aufgrund der starken Streuung keine statistische Relevanz nachgewiesen werden. Nur bezüglich *CYP4A24* war eine tendenziell gesteigerte mRNA-Konzentrationen in der Clofibratgruppe zu beobachten. Im Bereich der Glukoneogenese, des Fettsäuremetabolismus und der Ketogenese existiert mit dem PPAR α -Zielgen *FGF21* ein weiterer zentraler Faktor (Woo *et al.*, 2013).

Auch dessen Expression wurde in der vorliegenden Studie gemessen und es zeigte sich, dass durch den potenten Aktivator Clofibrat eine hochgradige Expressionssteigerung bewirkt werden konnte. Durch Fischöl und Energierestriktion ließ sich die relative mRNA-Konzentration von *FGF21* nicht nennenswert beeinflussen.

In der Muskulatur war eine Wirkung von Clofibrat auf die PPAR α -Zielgene stärker als in der Leber zu beobachten. In der Fischöl- und Energierestriktionsgruppe waren lediglich zwei der acht gemessenen relativen mRNA-Konzentrationen leicht erhöht, was folglich keine Aktivierung des PPAR α durch die jeweilige Behandlung vermuten lässt.

Die mit Clofibrat behandelte Gruppe war bei fünf der acht gemessenen Genen mit einer verstärkten Expression gegenüber der Kontrollgruppe vertreten. Da dies auf eine moderate Aktivierung des PPAR α hindeutet, was mit einer Erhöhung des Fettsäurestoffwechsels einhergehen würde, unterstützen dies die Aussage von Ringseis *et al.* (2011). Sie zeigten, dass der bei Sauen während der Laktation ein erhöhter Fettsäureverbrauch in der Muskulatur auftrat und dies aus der Aktivierung des PPAR α resultierte. Durch die Zufuhr von Clofibrat wurde diese bereits vorherrschende katabole Stoffwechsellaage noch verstärkt. Des Weiteren könnte die verminderte Konzentration freier Fettsäuren im Plasma der Clofibratgruppe dadurch begründet werden, dass diese durch einen erhöhten Verbrauch von Fettsäuren in der Muskulatur genutzt werden. Da sich die Milchfettgehalte in allen Gruppen auf dem gleichen Niveau befanden, kann eine vermehrte Verwertung von Fettsäuren zur Milchfettproduktion ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass lediglich durch die Verabreichung von Clofibrat eine moderate Aktivierung des PPAR α erreicht wurde. Fischöl und Senkung der Energiezufuhr schienen, an der schon grundsätzlich durch die Laktation hervorgerufene PPAR α -Aktivierung in der Leber (Rosenbaum *et al.*, 2013), keinen Effekt zu hervorzurufen.

Im Gegensatz zur Leber und Muskulatur zeigt die gemessenen mRNA-Konzentrationen der PPAR α -Zielgene im Fettgewebe erniedrigte Werte. Die Studie von Ringseis *et al.* (2011) zeigte, dass es in diesem Gewebe während der Laktation zu einer Verminderung der Expression einiger PPAR α -Zielgen kommt. Die Regulationsweise, die in diesem Gewebe zu einer Verminderung dieser Zielgene führt, ist bisher noch nicht bekannt. Durch Energierestriktion konnte die durch die Laktation auftretende Senkung der relativen mRNA-Konzentrationen bei vier der sechs gemessenen Gene im Fettgewebe während der Laktation verstärkt werden. Die Zugabe von Clofibrat scheint mit drei der sechs gemessenen Gene einen

leicht verstärkenden Effekt zu haben. In der Fischölgruppe war kein nennenswerter Effekt zu beobachten. Auf welchen Wirkmechanismus diese Beobachtung beruht, ist leider noch nicht bekannt. Jedoch scheinen durch einen negative Energiebilanz Fettsäuren vermehrt anderen Geweben als dem Fettgewebe zugeführt zu werden, wo sie wahrscheinlich der Energiegewinnung dienen.

6.2.3 Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Gene des Carnitinstoffwechsels

Für die Nutzung der Fettsäuren im Mitochondrium spielt Carnitin eine entscheidende Rolle. Es fungiert als Transporter der langkettigen Fettsäuren aus dem Zytosol in die Mitochondrien, wo sie über die β -Oxidation der Energiegewinnung dienen (McGarry und Brown, 1997; Rebouche und Seim, 1998). Carnitin wird entweder über das Futter zugeführt oder vom Körper selbst aus den zuvor in Proteinen gebundenen Aminosäuren Lysin und Methionin hergestellt (Carter *et al.*, 1995; Rebouche und Seim, 1998; Steiber *et al.*, 2004). Am Beginn der Synthese steht die Verbindung N^ε-Trimethyllysin (TML), die über das mitochondriale Enzym ϵ -Trimethyllysinhydroxylase (TMLHE), 3-Hydroxy-N^ε-Trimethyllysin-Aldolase und die cytosolische Aldehyd-Dehydrogenase 9A1 (ALDH9A1) zu γ -Butyrobetain (BB) umgewandelt wird (Carter *et al.*, 1995). Dieser Vorgang kann in den meisten Körperzellen von statten gehen (Rebouche und Seim, 1998). Aus BB wird in einem letzten Schritt durch die γ -Butyrobetain-Dioxygenase (BBOX1) L-Carnitin gebildet (Steiber *et al.*, 2004). Dieser Vorgang ist hauptsächlich in der Leber und Niere vorzufinden, welche im Anschluss an die Synthese diese Form des Carnitins über den Blutstrom anderen Organen zur Verfügung stellen (Steiber *et al.*, 2004). Der wichtigste Transporter des Carnitins in die Gewebe stellt der *Solute Carrier Family 22, member 5* (SLC22A5) dar (Tamai *et al.*, 1998). In den Geweben werden die aktivierten Fettsäuren über die CPT1 mit Carnitin zu Acylcarnitin verbunden und über den *Solute Carrier Family 25, member 20* (SLC25A20) in das Mitochondrium zur β -Oxidation transportiert (Carter *et al.*, 1995). Die Abspaltung der Fettsäure und Wiedergewinnung des Carnitins wird durch das Enzym CPT2 katalysiert (Carter *et al.*, 1995).

Da bewiesen wurde, dass bei Schweinen die Carnitinaufnahme und -synthese durch den PPAR α stimuliert wird (Ringseis *et al.*, 2009), wurde im Rahmen der vorliegenden Studie sowohl die Genexpression der zugrunde liegenden Enzyme in der Leber, als auch die Verbindungen L-Carnitin, Acylcarnitin, TML und BB untersucht. Die Plasmakonzentrationen

dieser Verbindungen wurden durch die vorliegende Behandlung nicht nennenswert beeinflusst. Da während der Laktation auch Carnitin zur Versorgung der Nachkommen in die Milch abgegeben wird (Hahn, 1982; Kerner *et al.*, 1984; Penn *et al.*, 1997; Woollard *et al.*, 1999), wurde auch diese auf Carnitin untersucht. Jedoch zeigten sich auch hier durch die vorgenommenen Behandlungen keine Effekte. Auf Genexpressionsebene waren teilweise verminderte mRNA-Konzentrationen zu finden. In der Fischölgruppe waren keine verminderten mRNA-Konzentrationen zu beobachten. Die restriktiv gefütterte Gruppe reagierte mit einer Verminderung der Expression der Gene der beteiligten Enzyme *ALDH9A1*, *BBOX1* und *SLC22A5*. Insgesamt liegen keine Studien vor, die diesen senkenden Effekt zuvor beobachteten. Daher ergibt sich keine Erklärung, wodurch es zu einer Absenkung der Gene im Carnitinstoffwechsel durch die Energierestriktion kam. Sowohl beim Nager als auch beim Schwein konnten bisher nur ein Anstieg des Carnitintransports und der -biosynthese während des Fastenzustand beobachtet werden (Luci *et al.*, 2008; Ringseis *et al.*, 2009). Da sich jedoch kaum Auswirkungen auf die Carnitinsynthese in der Milch und im Plasma ergeben, scheinen die Effekte auf Expressionsebene keinen beträchtlichen Einfluss zu besitzen.

Die Clofibratgruppe zeigte einen entgegengesetzten Effekt gegenüber den anderen Behandlungsgruppen. *SLC22A5* und *TMLHE* wurden vermehrt exprimiert, was auf einen erhöhten Carnitintransport und dessen Synthese hindeutet. Da in dieser Gruppe eine moderate PPAR α -Aktivierung in der Leber beobachtet wurde, kann diese für die vermehrte Expression der Gene die Carnitinaufnahme und -synthese verantwortlich sein. *SLC22A5* wurde bereits als PPAR α -Zielgen beschrieben (Ringseis *et al.*, 2009) und reagierte in der vorliegenden Arbeit durch Clofibrat erwartungsgemäß mit einer gesteigerten Expressionsrate. Im Plasma dieser Gruppe konnten leicht erhöhte Konzentrationen an BB gemessen werden, in der restriktiv gefütterten Gruppe war diese leicht vermindert. Eine Studie von Rebouche *et al.* (1986) beschrieb, dass bei der Syntheserate von Carnitin nicht die beteiligten Enzyme den limitierenden Faktor für die Carnitinsynthese darstellen, sondern dass die Verfügbarkeit der Vorstufen TML und BB für die Menge an synthetisiertem Carnitin entscheidend ist (Rebouche *et al.*, 1986). Warum es jedoch zu Veränderungen in der Plasmakonzentration von BB kam, bleibt ungewiss. Da sich jedoch die Konzentrationen an synthetisiertem Carnitin im Plasma der Behandlungsgruppen nicht veränderte, spielt dieser Effekt nur eine untergeordnete Rolle.

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass nur durch Clofibrat eine moderat gesteigerte PPAR α -Aktivierung in der Leber und Muskulatur hervorrufen werden konnte. Die Zugabe von Fischöl zeigte keinen Effekt. Die Reduktion der Energiezufuhr führte zu einem

senkenden Effekt bei den Genen der Carnitinaufnahme und -synthese. Milch- und Plasmaspiegel von Carnitin blieben unbeeinflusst. Die Carnitin-Vorstufe BB zeigte in der Clofibratgruppe leicht erhöhte Plasmaspiegel, in der Energierestriktionsgruppe eine leicht verminderte Plasmakonzentration.

6. 2. 4 Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Gene des Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsel

In der ersten Teilstudie konnte gezeigt werden, dass die Laktation keinen Effekt auf den Stoffwechsel von Triglyceriden und Cholesterin hatte. Da bekannt ist, dass der PPAR α Einfluss auf die Regulation der SREBPs nehmen kann (Roglans *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2001; Shiota *et al.*, 2003; Knight *et al.*, 2005; König *et al.*, 2007), sollte im Anschluss untersucht werden, ob sich die Expressionsraten der Gene des Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsels durch die vorgenommenen Behandlungen mit Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion verändern und somit Rückschlüsse auf eine Stimulation oder Hemmung der Stoffwechselwege geben.

Luci *et al.* (2007a) konnten zeigen, dass bei Schweinen nach PPAR α -Aktivierung durch Clofibrat zwar Zielgene des PPAR α vermehrt exprimiert wurden, diese Aktivierung jedoch keinen Veränderungen der SREBPs und ihrer Zielgene verursachten. Nur vereinzelte Gene, wie SCD erfuhren eine Veränderung, die der PPAR α -Aktivierung zugeschrieben wurde (Luci *et al.*, 2007a). Dies stand jedoch im Gegensatz zu den bei Nagern beobachteten Ergebnissen. Mäuse reagierten nach einer synthetischen Aktivierung des PPAR α mit einer Steigerung der Triglyceridbiosynthese (Knight *et al.*, 2005). Ratten zeigten eine Hemmung der Expression der am Cholesterinstoffwechsels beteiligten Enzyme (König *et al.*, 2007). Jedoch existieren auch Studien, die eine Unabhängigkeit des SREBP-System von dem des PPAR α beschreiben (Kim, 1999; Tanaka *et al.*, 2010). In der Studie von Rosenbaum (2012a) konnte gezeigt werden, dass bei Sauen eine PPAR α -Aktivierung durch die Laktation hervorgerufen wird. Ergebnisse der ersten Teilstudie weisen jedoch darauf hin, dass diese in keinem Zusammenhang mit der Expression der Zielgene der SREBPs und den dazugehörigen Stoffwechselwegen stand.

Sowohl *SREBF2*, als auch eine Vielzahl der dazugehörigen Zielgene reagierten in der restriktiv gefütterten Gruppe mit einer Verminderung der Genexpression. Auch einige der Zielgene des *SREBF1* verhielten sich gleichermaßen. In der Literatur ist die Verminderung von *SREBF1* und *SREBF2* zusammen mit ihren Zielgenen im Fastenzustand und deren Anstieg

bei Wiederaufnahme der Fütterung an Ratten bereits beschrieben worden (Horton *et al.*, 1998). Ein Abfall der Konzentrationen der *SREBF1* ist wäre dadurch zu erklären, dass die Triglyceridsynthese über die Insulinsensitivität der *Insigs* gesteuert wird (Rawson, 2003). Dabei ist *Insig-2a* die leberspezifische Isoform, die am stärksten von Änderungen des Insulin beeinflusst wird. Bei hohen Insulinkonzentration ist die Expressionsrate von *Insig-2a* sehr niedrig. Bei Energiemangel mit niedrigen Insulinspiegeln wird *Insig-2a* stark erhöht, was eine Blockade der Translokation des SCAP/SREBP-Komplexes und somit der Aktivierung zu nSREB-1c zur Folge hat (Rawson, 2003). Die Steuerung der Expression von *SREBF2* und dessen Zielgene wird über die Sterolsensitivität von SCAP vermittelt (Nohturfft, 1998; Brown und Goldstein, 1999). Bei Energiemangel kommt es zu einer Erhöhung der *High Density Lipoproteine* (HDL) im Blut (Adlouni *et al.*, 1997), denen die Aufgabe zukommt, Cholesterin aus der Peripherie der Leber zuzuführen (Dospil *et al.*, 2005). Bei einem hohen Cholesterinaufkommen in der Zelle, bindet es an SCAP und führt zu einer Konformationsänderung, die den SCAP/SREBP-Komplex an der ER-Membran gebunden hält (Brown *et al.*, 2002; Radhakrishnan *et al.*, 2004).

Auch Fischöl, mit hohen Anteilen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wird eine senkende Wirkung auf die Expression der SREBPs zugeschrieben. Diese wurde besonders für *SREBF1* bewiesen (Kim, 1999; Xu *et al.*, 1999; Yahagi, 1999; Tanaka *et al.*, 2010; Takeuchi *et al.*, 2010). In einer weiteren Studien konnte auch ein Effekt auf *SREBF2* nachgewiesen werden (Worgall, 1998). Die vorliegende Arbeit bestätigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen, da auch bei Sauen eine Reduktion der mRNA-Konzentrationen von *SREBF1* und einiger Zielgene eintrat, jedoch keine Veränderungen des *SREBF2* beobachtet werden konnte. Als Ursache wurde einerseits eine hemmende Wirkung der PUFAs auf die proteolytische Spaltung des SREBP-1c zum aktiven nSREBP-1c nachgewiesen (Takeuchi *et al.*, 2010). Zum anderen wurde die Hypothese beschrieben, dass PUFAs als Aktivatoren der neutralen Sphingomyelinasen die Freisetzung von Cholesterin erhöhen würden und daraufhin über einen erhöhten Cholesterinspiegel eine Hemmung hervorrufen, die die Translokation der SREBPs zum Golgi-Apparat verhindern könnten (Worgall, 1998).

Die Ergebnisse der Clofibratgruppe bestätigen das durch Luci *et al.* (2007a) hervorgebrachten Ergebnis, dass durch Clofibrat beim Schwein die Expressionsrate von *SCD* gesteigert wird. *SCD*, die bei Mäusen als PPAR α -Zielgen bekannt ist (Miller und Ntambi, 1996), erfuhr in der Clofibratgruppe ebenfalls eine verstärkte Expression. Sonstige *SREBF1*-betreffende Gene waren unverändert. Hier zeigte selbst *SREBF1* keine Abweichungen zur Kontrolle. Interessanter Weise lagen bei den Genen der Cholesterinbiosynthese in der Leber

der Clofibratgruppe zum Teil erhöhte mRNA-Konzentrationen vor. Dies konnte in der Studie von Luci *et al.* (2007a) jedoch nicht beobachtet werden; die Gene der SREBPs blieben hier bis auf *SCD* durch Clofibrat unbeeinflusst. Daher scheint der Effekt auf die Gene der Cholesterinsynthese nicht auf eine durch den PPAR α vermittelte Wirkung zu basieren, sondern über einen bisher unklaren Wirkmechanismus hervorgerufen zu werden.

6. 2. 5 Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Gene des Muskelabbaus

Ringseis *et al.* (2013) gelang es erstmals zu beweisen, dass bei Nagern die Gene des UPS im Bereich des Muskelabbaus durch den PPAR α beeinflusst werden konnten. Die vorliegende Arbeit bietet Hinweise darauf, dass dies ebenfalls bei der Zuchtsau der Fall ist, da auch hier durch die Behandlung mit Clofibrat über die moderate Aktivierung des PPAR α im Bereich der Gene des UPS bei den E3-Ligasen *FBXO32* und *TRIM63*, sowie *UBB* eine erhöhte Expression beobachtet werden konnte. Jedoch bleibt nicht auszuschließen, dass es ebenfalls eine PPAR α -unabhängige Wirkung sein könnte, da die Gruppe mit Fischölaufuhr ebensolche Effekte analog der Clofibratgruppe zeigte und hier keine PPAR α -Aktivierung ersichtlich war.

Die restriktiv gefütterte Gruppe reagierte ebenfalls mit einer Erhöhung eines dieser Gene (*FBXO32*). *TRIM63* zeigte trotz erhöhtem Wert aufgrund hoher Streuung keine Signifikanz. Da Energierestriktion als allgemeine Ursache der Aktivierung des UPS und der vermehrten Rekrutierung von Proteinen gilt (Li und Wassner, 1984; Lowell *et al.*, 1986) ist es nicht verwunderlich, dass auch in der vorliegenden Arbeit in der restriktiv gefütterten Gruppe eine leichte Aktivierung des UPS vorliegt. Die erhöhte Proteolyse soll die Versorgung des Organismus mit Energie und der Aufrechterhaltung der Milchsynthese gewährleisten, die über das Futter nicht zu erbringen ist (Clowes *et al.*, 2005). Ob allerdings die PPAR α -Aktivierung oder ein weiterer Reaktionsweg für die Steigerung des UPS verantwortlich ist, konnte mittels dieser Studie nicht dargelegt werden. Die Gruppen mit Fischölaufuhr und Energierestriktion zeigten bei der Untersuchung der PPAR α -Aktivierung keine Effekte durch die Behandlung, jedoch wiesen alle Gruppen im Bereich des UPS ein gleich hohes Niveau auf. Daher kann eine andere Regulationsweise nicht ausgeschlossen werden.

In der Milch der Fischöl- und Clofibratgruppe konnten erhöhte Konzentrationen an Protein gemessen werden. Durch die Stimulation der essentiellen Gene des UPS liegt eine verstärkte Mobilisation von muskulärem Protein nahe. Die erhöhten Milchproteingehalte der Fischöl- und Clofibratgruppe könnten über vermehrt freiwerdende Aminosäuren, die der Milchdrüse der Proteinsynthese zur Verfügung stünden, bedingt werden. Daher führten die die

Behandlungen mittels Fischöl und Clofibrat zu einer verbesserten Proteinversorgung der Würfe.

Zusammenfassend ergeben sich Hinweise darauf, dass die Zufuhr von Fischöl und Clofibrat zu einer Stimulation der Gene des UPS und dies zur einer besseren Proteinversorgung der Ferkel führt.

6.2.6 Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Gene des Entzündungsgeschehens und der antioxidativen Abwehr

Sauen durchleben mit der Umstellung von der Phase der Trächtigkeit zur Laktation eine moderate anpassungsbedingte Entzündungsreaktion mit einer entsprechend gesteigerten Synthese an Akute-Phase Proteinen (Sorrells *et al.*, 2007; Verheyen *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2012a). Mit dem Geburtsvorgang kommt es zu körperlichem und metabolischem Stress (Sordillo *et al.*, 2009). Im Endometrium findet zu diesem Zeitpunkt eine Infiltration mit Entzündungszellen statt (Jiwakanon *et al.*, 2006), was in einer Freisetzung von Zytokinen resultiert (Loor *et al.*, 2005). All diese Vorgänge enden in einer Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors der Entzündung, dem NF- κ B (Siebenlist *et al.*, 1994; Pahl, 1999). Mit Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors kann es im Laufe der Inflammation zur Freisetzung von ROS kommen, die im Zuge des oxidativen Stresses weitere Entzündung bedingen.

In einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe konnte ein Hinweis auf die Aktivierung der antioxidativen Abwehr über den Anstieg oxidativen Stresses in der Phase der Laktation beobachtet werden (Rosenbaum *et al.*, 2012b). Diese Reaktionen wurden bei klinisch gesunden Tieren beobachtet. Nehmen diese Reaktion Überhand, kann es zu schweren Fällen postpuerperaler Erkrankungen kommen, die ein großes Problem im Bereich landwirtschaftlicher Nutztiere darstellen.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob durch die durchgeführten Behandlungen mittel Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion positive Effekte mit einhergehender Reduktion der vorhandenen Entzündungsreaktion während der Laktation erzielt werden konnten.

Bezüglich marinen Öls ist eine antiinflammatorische Wirkung bereits bekannt. Fischöl ist reich an Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) (Sargent *et al.*, 1999, Calder und Grimble, 2002). Wird Fischöl über Nahrung vermehrt zugeführt, werden diese im Fischöl vorkommenden ω 3-Fettsäuren verstärkt in den Zellmembranen zu Lasten des Anteils der Arachidonsäure (AA) eingebaut (Calder und Grimble, 2002). Im physiologischen Zustand

fungiert AA als Substrat zur Synthese von Eicosanoiden, wozu die Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane gezählt werden (Dospil *et al.*, 2005). Diese sind tief greifend am Entzündungsgeschehen beteiligt (Lewis *et al.*, 1990; Tilley *et al.*, 2001). Steht nun vermehrt EPA und DHA zur Verfügung, werden diese über die gleichen Enzyme wie AA umgebaut, was zur Entstehung ähnlicher Eicosanoidmoleküle führt, die jedoch eine geringere Aktivität an den entsprechenden Rezeptoren aufweisen (Calder, 2012). Somit führt eine Zufuhr von Fischöl zu einer Verminderung aktiver Eicosanoide aus AA und zu einer verstärkten Bildung von minderpotenten EPA und DHA-Derivaten (Calder, 2012). Des Weiteren führen EPA und DHA zur Bildung von Resolvinen und Protektinen, die über die Hemmung von $\text{TNF}\alpha$, LTB_4 und der T-Zellmigration eine ebenso antiinflammatorische Wirkung besitzen (Serhan *et al.*, 2002; Serhan *et al.*, 2008).

Diese Wirkung des Fischöls konnte in der vorliegenden Arbeit in schwacher Form beobachtet werden. Ein Großteil der gemessenen Zielgene des NF- κ B in der Leber zeigte numerisch verminderte Expressionsraten, wobei drei signifikant erniedrigt waren. In der Muskulatur war unter den gemessenen Genen ein solcher Effekt nicht zu finden. Ebenfalls konnte in der Leber eine Verminderung der relativen mRNA-Konzentrationen einiger Nrf2-Zielgene verzeichnet werden, was auf eine Verminderung der Aktivität der antioxidativen Abwehr hindeutet. Dies könnte darauf beruhen, dass mit einer Absenkung der inflammatorischen Zielgene das Entzündungsgeschehen und daraufhin die Bildung von ROS vermindert wurde. Dadurch wäre eine erhöhte Aktivität des Nrf2 nicht mehr vonnöten und würde folglich ebenfalls vermindert werden. In der Muskulatur zeigten die Zielgene des Nrf2 aufgrund teilweiser hoher Streuung keine eindeutigen Effekte.

Wie bereits beschrieben kann der PPAR α ebenfalls ins Entzündungsgeschehen eingreifen. Über die vermehrte Expression des Inhibitormoleküls I κ B α wird der NF- κ B in seiner Bindungsaktivität gehemmt (Delerive, 2002). Dies führt zu einer verminderten Expression weiterer proinflammatorischer Proteine und somit zur Unterdrückung des Entzündungsgeschehens (Delerive, 2002). Da Fischöl über seine enthaltenen PUFAs ebenfalls als PPAR α -Aktivator agieren kann, wäre dies ebenfalls eine Möglichkeit über die Fischöl eine antiinflammatorische Wirkung erzielen könnte. Jedoch war in der vorliegenden Arbeit kein PPAR α -aktivierender Effekt durch Fischöl zu beobachten, sodass die direkte Wirkung über die Bildung minderpotente Eicosanoide plausibler erscheint.

In der Leber der Clofibratgruppe ist ein schwacher entzündungshemmender Effekt über den PPAR α zu beobachten. *SAA*, *IL8* und *LBP* zeigten eine verminderte Expression ihrer mRNA, was auf eine verminderte Bildung der reifen Proteine hindeutet. Die Ergebnisse der

Messung der Nrf2-Zielgene in der Leber zeigen keinen Effekt von Clofibrat auf Gene der antioxidative Abwehr. Da jedoch auch nur geringe Anzeichen auf eine antiinflammatorische Wirkung zu beobachten war, wurde womöglich das ROS-Aufkommen als auslösende Stimuli des Nrf2 nicht in dem Maße vermindert, sodass eine Herunterregulierung des Nrf2 eintreten konnte.

In der Muskulatur war ebenso kein durch Clofibrat vermittelter antiinflammatorischer Effekt zu beobachten. Auch sah man hier keinen senkenden Effekt auf Gene des Nrf2. Tatsächlich führte Clofibrat bei einer Vielzahl von Nrf2-Zielgenen zu einer Erhöhung der Expressionsrate. Da in dieser Behandlungsgruppe die Genexpressionsanalyse Hinweise auf einen gesteigerter Fettsäurestoffwechsel gaben, ist es denkbar, dass eine Steigerung dieses auf die Energiegewinnung ausgelegten Stoffwechselabschnitts zu einer verstärkten Produktion von ROS führt (Lenaz, 2001). Dies würde folglich die Aktivierung der antioxidativen Abwehr bedingen und die Transkription der Gene antioxidativer Enzyme einleiten.

In der restriktiv gefütterten Gruppe führte der Energiemangel ebenso zu einer Reduktion des Entzündungsgeschehens in der Leber. Hier war gegenüber den anderen Behandlungsgruppen sogar der größte Effekt zu verzeichnen. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die negative Energiebilanz wahrscheinlich nicht Ursache der laktationsbedingten Entzündungsreaktion ist, sondern dass moderater Energiemangel sogar positive Effekte auf das hepatische Inflamationsprofil haben kann. Studien bei Menschen zeigten vermehrt auf, dass eine Verminderung in der Kalorienzufuhr mit einer Verminderung von Entzündungsmediatoren und der vermehrten Bildung antiinflammatorischer Substanzen einhergeht (Ziccardi *et al.*, 2002; Clément *et al.*, 2004; Selvin *et al.*, 2007; Shoelson *et al.*, 2007). Entsprechende Ergebnisse konnte gleichermaßen bei Nagern beobachtet werden (Spaulding *et al.*, 1997; Chandrasekar *et al.*, 2001; Ugochukwu und Figgers, 2007).

Aus der Literatur ist allgemein bekannt, dass die Gegenspieler Insulin und Glukokortikoide zum Gleichgewicht des Energiehaushalt beitragen (Strack *et al.*, 1995). Glukokortikoide werden bei Energiemangel freigesetzt und bewirken eine Induktion der Glukoneogenese, Proteo- und Lipolyse (Dospil *et al.*, 2005). Des Weiteren weisen Glukokortikoide eine antiinflammatorische Wirkung auf (Leakey, *et al.*, 1994). Dies wird einerseits über die Hemmung des NF- κ B durch eine Steigerung der Produktion von I κ B-Proteinen vermittelt (Auphan *et al.*, 1995), andererseits über Aktivierung von Lipokortin, welches die Produktion von Eicosanoide über die Hemmung der Phosphorlipase A₂ vermindert (Flower, 1988). Daher wäre es möglich, dass in der vorliegenden Arbeit der antiinflammatorische Effekt über die freigesetzten Glukokortikoide vermittelt wird.

Da auch in der restriktiv gefütterten Gruppe die mRNA-Konzentrationen der Zielgene des Nrf2 in der Leber vermindert waren, ist wiederum anzunehmen, dass dies eine Begleiterscheinung des antiinflammatorischen Effekts darstellen könnte.

In der Muskulatur führte die Restriktion der Energiezufuhr zu keinen Veränderungen der gemessenen Zielgene des NF- κ B. Jedoch konnte Hinweise auf einen geringer Anstieg der antioxidativen Abwehr beobachtet werden. Als stellvertretendes Enzym des antioxidativen Status im Plasma wurde auch die Aktivität der GPX gemessen. Diese wies in allen drei Behandlungsgruppen ebenfalls eine erhöhte Aktivität auf und deckt sich daher mit den Ergebnissen, die in der Muskulatur beobachtet wurden. Daher ist es möglich, dass eine erhöhte Aktivität der antioxidativen Abwehr im Organismus vorliegt; die Wirkung der Behandlungen mittels Fischöl und Energierestriktion scheinen nur in der Leber Effekte zu erzielen. Da im Folgenden erörtert wird, dass bei der Messung von Genen der UPR ein leichter Effekt einer Aktivierung der UPR in dieser Behandlungsgruppe vorlag und der Nrf2 eines der Zielgene der UPR darstellt (Cullinan *et al.*, 2003), könnte dieser für die erhöhten Expressionsraten der Nrf2-Zielgene verantwortlich sein. Nach einer Theorie von Ristow und Schmeisser (2011) (Theorie der Mitohormese) führt eine Reduktion der täglichen Energiezufuhr zu einer Steigerung der mitochondrialen Aktivität, was mit einer Produktion von ROS einhergeht. Diese ROS dienen im Folgenden zur Stimulieren so genannter '*longevity genes*', wozu Gene der oxidativen Abwehr, der Phase-II-Reaktion gezählt werden, die positive Effekte einer lebensverlängernde Wirkung haben (Ristow und Schmeisser, 2011). Diese Theorie der Mitohormese wäre in unserem Fall ebenso möglich und könnte in der restriktiv gefütterten Gruppe zu der schwachen Nrf2-Aktivierung führen.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die vorgenommenen Behandlungen mit Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion eine antiinflammatorische Wirkung in der Leber aufwiesen, wobei der Effekt in der restriktiv gefütterten Gruppe am stärksten war. In der Muskulatur waren die mRNA-Konzentrationen der NF- κ B-Zielgene nicht nennenswert verändert. Zielgene des Nrf2 waren in der Leber analog der NF- κ B-Zielgene vermindert, was als Begleiterscheinung der Hemmung zu vermuten ist. In der Muskulatur wies die Clofibratgruppe möglicherweise aufgrund des erhöhten Fettsäurestoffwechsels eine Aktivierung der antioxidativen Abwehr auf.

6. 2. 7 Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf Gene der UPR

Basierend auf den Erkenntnissen zur UPR aus dem ersten Versuch, die zeigten, dass durch die Laktation Gene der UPR erhöhte Expressionsraten aufzeigten, wurde die Wirkung von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf diese Gene untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass in allen drei Behandlungsgruppen Verminderungen der relativen mRNA-Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe auftraten, die in der restriktiv gefütterten Gruppe am stärksten zur Geltung kamen. Die Clofibratgruppe zeigte den geringsten Effekt. Daher ist zu vermuten, dass die Verminderung des ER-Stresses womöglich weniger über den PPAR α sondern eher durch die antiinflammatorische Wirkung von Fischöl und Energierestriktion vermittelt wird. Eine Reduktion des Entzündungsgeschehens könnte über eine verminderte Freisetzung von ROS, analog zu Nrf2, zu einer Verminderung auslösender Stimuli von ER-Stress und somit zu einer Absenkung der UPR führen.

In der Muskulatur konnte bei Genen der UPR ein ähnliches Bild der Ergebnisse beobachtet werden, wie es auch bei der Analyse der Zielgene des Nrf2 der Fall war. In der Gruppe mit Fischölsulage zeigten sich keine Veränderungen. In der Clofibratgruppe wiesen vier der 13 gemessenen UPR-Gene erhöhte relative mRNA-Konzentrationen auf, wie es auch in der restriktiv gefütterten Gruppe der Fall war. Daher könnte oxidativer Stress durch den gesteigerten Fettsäurekatabolismus in der Clofibratgruppe, der auch zur Aktivierung des Nrf2 führen könnte, ebenfalls zur Verstärkung von ER-Stress beitragen. Des Weiteren ist bekannt, dass der Nrf2 durch die Stimulation des Signalwegs von PERK aktiviert wird (Cullinan *et al.*, 2003). Demzufolge könnte die leichte Aktivierung der UPR in der Clofibrat- und Energierestriktionsgruppe zur Stimulation des Nrf2 führen würde. Daher wäre es möglich, dass in der Clofibratgruppe der gesteigerte Fettsäurestoffwechsel an sich, als auch die Aktivierung der UPR, als Antwort auf ein erhöhtes Vorkommen von ER-Stress, Ursache für die Stimulation der Expression des Nrf2 und dessen Zielgene ist. Was in der restriktiv gefütterten Gruppe Ursache der leichten Aktivierung der UPR und des Nrf2 darstellt, bleibt bislang unklar, da weder Hinweise auf eine Aktivierung des PPAR α , noch eine Stimulation des NF- κ B gegeben sind. Jedoch könnten auch die nach der bereits beschriebene Theorie der Mitohormese durch Energierestriktion entstehenden ROS zu Aktivierung der UPR führen.

Zusammenfassend konnte mittels dieser Studie gezeigt werden, dass sowohl die Zugabe von Fischöl und Clofibrat, als auch die Senkung der Energiezufuhr in der Leber zu einer Senkung der Gene der UPR führte. Dieser Effekt konnte in der Muskulatur nicht beobachtet werden. Hier zeigte sich durch Clofibrat und Energierestriktion ein schwacher,

entgegengesetzter Effekt, der in der Clofibratgruppe womöglich auf den erhöhten Fettsäurekatabolismus in der Muskulatur beruht.

6. 2. 8 Einfluss von Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion auf die Zusammensetzung der Milch

Anhand der Analyse der gewonnenen Milch des 20. Tags der Laktation konnte dargelegt werden, dass die Milchezusammensetzung durch die vorgenommenen Behandlungen keine nennenswerte Veränderung erfuhren. Allein der Proteingehalt war in den Gruppen mit Fischöl- und Clofibrat leicht erhöht. Erhöhte relative mRNA-Konzentrationen der essentiellen Gene des UPS in der Muskulatur geben Hinweise auf eine eventuell verstärkt vorliegende Proteolyse. Diese könnte die Ursache der erhöhten Konzentrationen des Milchproteins darstellen. Der Fett-Protein-Quotient, der bei Milchkühen häufig als Indikator einer negativen Energiebilanz verwendet wird (Heuer *et al.*, 2000, 2001), ist bei Kühen ab einem Wert über 1,5 verstärkt mit metabolischen Erkrankungen assoziiert (Geishauser *et al.*, 1997; Heuer *et al.*, 1999). Dieser Wert wurde auch in der vorliegenden Studie bestimmt und zeigte in diesem Fall nur einen erniedrigten Wert in der Fischölgruppe gegenüber der Kontrolle. Die übrigen Gruppen waren diesbezüglich unverändert; alle lagen aber unterhalb des Grenzwerts der Kühe. Jedoch existieren in der Literatur spezielle für die Spezies Schwein kein gesonderter Grenzwert, was lediglich Vermutungen zulässt. Da jedoch nach Berechnungen der Energiebilanz über den Bedarf der Sauen und das aufgenommene Futter in der restriktiv gefütterten Gruppe definitiv eine negative Energiebilanz vorlag, scheint der Fett-Protein-Quotient der Milch als Indikator bei Schweinen weniger geeignet zu sein.

Die Konzentrationen an Carnitin und seinen Vorstufenverbindungen zeigten keine Veränderungen. Die Vitamingehalte blieben ebenso annähernd unbeeinflusst. Nur γ -Tocopherol wies in der Fischölgruppe eine geringere Konzentration gegenüber den anderen Gruppen auf. Sojaöl besitzt einen der höchsten Gehalte an γ -Tocopherol unter den pflanzlichen Ölen (Fisher, 1945; Sheppard *et al.*, 1993). Fischöl stellt zwar eine Quelle für α -Tocopherol dar, jedoch ist sein γ -Tocopherolgehalt verschwindend gering bis nicht detektierbar (Sheppard *et al.*, 1993). Da die Fischölgruppe als Fettgrundlage ausschließlich marines Öl aufnahm und keine zusätzliche Versorgung an Soja- oder Palmöl erhielten, spiegelt sich diese geringere Zufuhr an γ -Tocopherol auch in der Milch wieder. Alle anderen Gruppen erhielten zur Diät pflanzliche Öle (Soja- und Palmöl) und wiesen alle einen einheitlichen γ -Tocopherolspiegel in der Milch auf.

Im Plasma der Clofibratgruppe konnte eine geringere Konzentration an NEFA und eine erhöhte Expression von LPL in der Muskulatur beobachtet werden. Die NEFA dienten vermutlich als Substrate der gesteigerten Energiegewinnung in der Muskulatur. Eine erhöhte Bildung von LPL in der Muskulatur spricht des Weiteren für eine verstärkte Gewinnung von Fettsäuren aus triglyceridhaltigen Lipoproteinen.

Die Fettsäureverteilung der Majorfettsäuren in der Milch der Kontrollgruppe entsprach in etwa der in der Literatur beschriebenen Anteile von C 16:0 von ca. 24 - 26 %, von C 18:1 ω 9 von etwa 32 - 51 % und C 18:2 ω 6 mit 7 - 21 % (Kirchgeßner, 2008; Cordero *et al.*, 2011; Rekiel *et al.*, 2011). Innerhalb des Fettsäuremusters der Milch spiegelte sich ebenfalls die Verabreichung von Fischöl mit hohen Maßen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren bzw. ω 3-Fettsäuren wieder. Fischöl enthält Eicosapentaensäure (EPA, C 20:5 ω 3) und Docosahexaensäure (DHA, C 22:6 ω 3) mit Anteilen von 20 bzw. 26 % (Sargent *et al.*, 1999), Calder und Grimble, 2002). Diese Fettsäuren konnten mit stark erhöhten Anteilen im Fettsäuremuster detektiert werden. Der Literatur zu entnehmen weist Sauenmilch üblicherweise einen Gehalt dieser beiden Fettsäuren von jeweils unter 0,5 % auf (Kirchgeßner, 2008; Cordero *et al.*, 2011). Diese Werte stimmen in etwa mit der Milch der Kontrolle des zweiten Versuch überein. Durch die Verabreichung von Fischöl konnte der Anteil von EPA von 0,2 % auf etwa 3,4 % gesteigert werden; der Anteil von DHA von unter 0,05% auf etwa 1,7 %. Die Zufuhr von Fischöl mit ca. 34 % ω 3-Fettsäuren steigerte den Gesamtanteil an ω 3-Fettsäuren in der Milch etwa um das 4-fache. Diese Fettsäuren standen somit auch den Ferkeln über die Milch zur Verfügung, was auf deren Stoffwechsel ebenso positive Effekte haben könnte. Die restriktiv gefütterte Gruppe reagierte bei der Fettsäurezusammensetzung lediglich mit Veränderungen einzelner Fettsäureanteile. Clofibrat bedingte in der Milch eine Verschiebung des Gleichgewichts der Fettsäureverteilung zu Lasten der PUFA mit Erhöhung des Anteils an SFA. Im Plasma konnte eine geringere Konzentration an NEFA und eine erhöhte Expression von LPL in der Muskulatur beobachtet werden. Die NEFA dienten vermutlich als Substrate der gesteigerten Energiegewinnung in der Muskulatur. Eine erhöhte Bildung von LPL in der Muskulatur spricht des Weiteren für eine verstärkte Gewinnung von Fettsäuren aus triglyceridhaltigen Lipoproteinen. Aufgrund der Erhöhung des Fettstoffwechsels in der Muskulatur standen womöglich triglycerinhaltige Lipoproteine weniger der Milchsynthese zur Verfügung und könnte als Ursache für den Abfall an PUFA in der Milch in Betracht gezogen werden. Eine Studie von Ringseis *et al.* (2007) an laktierenden Ratten zeigte, dass eine PPAR α -Aktivierung durch oxidierte Fette mit einem Einbruch der Triglyceridkonzentration in der Milch, durch eine Einschränkung der

Transportleistung von Fettsäuren in die Milchdrüse, einherging. Sie führte zu einer Beeinträchtigung der Entwicklung der Nachkommen (Ringseis *et al.*, 2007). Hier nahm der Triglyceridgehalt der Milch der Behandlungsgruppe etwa um 35 % gegenüber der Kontrollgruppe ab (Ringseis *et al.*; 2007). Da in der vorliegenden Teilstudie durch die Behandlung von Clofibrat in der Leber ein schwacher PPAR α -aktivierender Effekt zu beobachten war, wäre bei einer Ratten-ähnliche Reaktionsweise bei Sauen ebenso eine Verminderung des Milchfettgehaltes aufgetreten. Da sich jedoch die Milchfettgehalte aller Gruppen nicht signifikant von einander unterschieden, liegt die Vermutung nahe, dass Sauen nicht mit einer verminderten Triglyceridsynthese in der Milchdrüse auf eine PPAR α -Aktivierung reagieren. Da sich auch die Wurfzunahmen der Gruppen nicht unterschieden, scheinen sich sowohl die Zusätze von Fischöl und Clofibrat, als auch die Verminderung der Energiezufuhr nicht negativ auf die Entwicklung der Ferkel auszuwirken.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die vorgenommenen Behandlungen mit der Intention einer PPAR α -Aktivierung die Milchzusammensetzung bezüglich ihrer Komponenten nicht beeinträchtigt wird. Dies stand im Gegensatz zur zuvor aufgestellten Hypothese, dass Sauen ebenso wie Ratten mit einer Unterversorgung der Nachkommen aufgrund einer Aktivierung des PPAR α reagieren würden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Behandlungen sogar zu einer verstärkten Proteinversorgung beitrugen. In der Fischölgruppe konnte eine Weitergabe der ω 3-Fettsäuren an die Ferkel über die Milch dargestellt werden.

7 Fazit

Die erste Teilstudie sollte, zusätzlich zu den Erkenntnissen der Studie von Rosenbaum *et al.* (2012a), weitere Hinweise auf laktationsbedingte Veränderungen im Metabolismus der Sau liefern. Rosenbaum *et al.* (2012a) zeigten, dass Gene des Fettsäurekatabolismus, der Carnitinaufnahme, des Citratzyklus, der Zellatmung und Gene zur Nutzung glycolygener Aminosäure in der Leber durch die Laktation vermehrt exprimiert waren und eine Aktivierung des PPAR α vermuten ließ. Die vorliegende erste Teilstudie deutete darauf hin, dass Sauen durch die Laktation im Bezug auf den Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsel in der Leber und den muskulären Proteinabbau keine Veränderungen erfahren. Ebenfalls lieferten Rosenbaum *et al.* (2012a, 2012b) Hinweise, dass Sauen, ebenso wie Milchkühe während der Laktation eine anpassungsbedingte Entzündungsreaktion mit Aktivierung der antioxidativen Abwehr in der Leber aufweisen. Die Ergebnisse des vorliegenden ersten Versuchs ergaben zudem Hinweise auf eine Stimulation der UPR.

Im zweiten Versuch sollte überprüft werden, inwiefern sich eine Behandlung mit Fischöl, Clofibrat und Energierestriktion, als natürliche oder synthetische Aktivatoren des PPAR α , auf ausgewählte Stoffwechsel- und Signalwege, die im Bezug zum PPAR α stehen, in der Laktation auswirken. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten, dass nur durch Clofibrat in Leber und Muskulatur eine moderate PPAR α -Aktivierung hervorgerufen werden konnte, wobei der Effekt in der Muskulatur stärker zu sehen war. Es gab Hinweise auf einen erhöhten Fettsäurestoffwechsels in der Muskulatur, was im Einklang mit einer verminderten Konzentration von NEFAs im Plasma steht. Im Fettgewebe führte Clofibrat zu einer Hemmung von PPAR α -Zielgenen. Ebenso gab es Hinweise auf einen verstärkten Carnitinstoffwechsel und Cholesterinsynthese in der Leber. Des Weiteren ließen die Ergebnisse die Vermutung auf eine erhöhte Proteolyse zu, was im Zusammenhang mit einer erhöhten Konzentration an Milchprotein steht. Im Bereich des laktationsbedingten Entzündungsgeschehens zeigte Clofibrat in der Leber einen schwachen antiinflammatorischen Effekt. Zielgene des Nrf2 waren womöglich aufgrund des gesteigerten Fettsäurestoffwechsels in der Muskulatur erhöht. Ebenso zeigten Gene der UPR in der Muskulatur erhöhte Expressionsraten.

Die Zufuhr von Fischöl zeigte in Leber und Muskulatur keine Effekte auf Zielgene des PPAR α . Des Weiteren konnten Hinweise geliefert werden, dass durch die Behandlung mit Fischöl eine Aktivierung des Muskelabbaus hervorgerufen werden konnte, was wie in der Clofibratgruppe mit der Erhöhung des Milchproteins in Verbindung gebracht werden kann.

Neben dem Anstieg des Milchproteins führte die Zufuhr von Fischöl in der Milch zu einer Erhöhung des Anteils an ω 3-Fettsäuren. Darüber hinaus legen die Ergebnisse nahe, dass durch Fischöl eine Hemmung der Triglyceridsynthese in der Leber bedingt wird. Im Bereich des laktationsbedingten Entzündungsgeschehens deuten die Ergebnisse darauf hin, dass durch die Gabe von Fischöl das Entzündungsgeschehen in der Leber abgeschwächt werden konnte, was sich auch bei Genen der UPR bemerkbar machte. Veränderungen bezüglich der Gene antioxidativen Abwehr konnten nicht beobachtet werden.

Die Energierestriktion ergab entsprechend des Fischöls keine Effekte auf die Zielgene des PPAR α . Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse lieferten Hinweise auf eine verminderte Carnitinsynthese und -aufnahme, einen leicht erhöhten Muskelabbau und einer Hemmung der Triglycerid- und Cholesterinsynthese. Eine restriktive Fütterung hätte demzufolge keinen negativen Einfluss auf den Stoffwechsel der Sauen. In der Leber deuten die Genexpressionen auf eine Abschwächung des Entzündungsgeschehens, der antioxidativen Abwehr und der UPR hin, in der Muskulatur zeigten sich entgegengesetzte Effekte.

Alle drei Behandlungen wirkten sich nicht negativ auf die Milchzusammensetzung und die Ferkelentwicklung aus. Fischöl könnte daher eingesetzt werden, um die Tiergesundheit der laktierenden Sau zu verbessern, ohne die Wurfentwicklung zu beeinträchtigen.

8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Bedeutung des Peroxisomenproliferator-aktivierten Rezeptor α während der Laktation der Sau. Bei Ratten wurde beobachtet, dass es in der Laktation durch eine Herunterregulierung des PPAR α zu einer verminderten Fettsäureoxidation und Verringerung der Thermogenese kommt, um Energie und Substrate zur Milchproduktion einzusparen. Des Weiteren führten PPAR α -Aktivatoren zu einer Störung dieser Adaptationsmechanismen, was in einem Einbruch der MilCHFettsynthese und der Entwicklung der Nachkommen resultierte. Kürzlich wurden verschiedene Adaptationsmechanismen von Stoffwechselwegen der Sau während der Laktation beschrieben, welche zeigten, dass die bei der Ratte vorkommenden Adaptationsreaktionen bei der Sau nicht auftreten. Im Gegenteil kommt es in der Laktation bei der Sau zu einer Aktivierung des PPAR α und Stimulation der abhängigen Stoffwechselwege. Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einfluss der Laktation auf den Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsel und den muskulären Proteinabbau zu untersuchen. Darüber hinaus wurde jüngst gezeigt, dass es bei der Sau während der Laktation zu einer anpassungsbedingten Entzündungsreaktion in der Leber kommt. Auf Grund dessen sollte untersucht werden, ob durch die vorhandene Entzündung auch Veränderungen der *Unfolded Protein Response* auftreten. Des Weiteren war es Ziel der Studie durch synthetische (Clofibrat) oder nutritive (Fischöl) Agonisten des PPAR α oder durch eine physiologische Situation, die zu einer PPAR α -Aktivierung führt (Energierestriktion) zu untersuchen, ob die Anpassungsmechanismen des Stoffwechsels der Sau während der Laktation wie bei Ratten durch eine PPAR α -Stimulation gestört werden und in einer Beeinträchtigung der Ferkelentwicklung resultiert. Zusätzlich wurde auch die Wirkungen der Behandlungen auf die anpassungsbedingten Entzündungsreaktion und zellulärer Anpassungsmechanismen (Nrf2, UPR) untersucht.

Hierzu wurden zwei Versuche durchgeführt. Im ersten Versuch wurden 10 von 20 tragenden Sauen nach dem Abferkeln die Ferkel entzogen, die im Folgenden die Milchproduktion einstellten und als nicht-laktierende Kontrollgruppe dienten. Im zweiten Versuch erhielten Gruppen von je 10 laktierenden Sauen entweder ein Kontrollfutter (Kontrollgruppe), dasselbe Futter, das mit 50 g Fischöl (Fischölgruppe) oder 2 g Clofibrat (Clofibratgruppe) pro kg ergänzt wurde oder sie erhielten das Kontrollfutter, dass in seiner Menge reduziert wurde, sodass die Sauen nur 75 % ihres täglichen Energiebedarfs erhielten.

Die Ergebnisse lieferten Hinweise darauf, dass sowohl der Triglycerid- und Cholesterinstoffwechsel in der Leber als auch der muskuläre Proteinabbau nicht durch die Laktation beeinflusst wurde und dass eine Stimulation der UPR während der Laktation vorliegt.

Durch die verschiedenen Behandlungen mit der Intention einer PPAR α -Aktivierung konnte nur Clofibrat in Leber und Muskulatur zu einer moderaten Stimulation des PPAR α führen. Fischöl und Energierestriktion zeigten hierbei keine Effekte. Darüber hinaus legten die Genexpressionen nahe, dass durch Fischöl während der Laktation der muskuläre Proteinabbau angeregt, die Triglyceridsynthese in der Leber gehemmt und das Entzündungsgeschehen und die UPR abgeschwächt werden konnte. Die Ergebnisse der Behandlung mit Clofibrat deuten an, dass es durch diese Behandlung zu einer Stimulation des Carnitinstoffwechsels und der Cholesterinsynthese in der Leber und des muskulären Proteinabbau während der Laktation kam. Jedoch war ein antiinflammatorischer Effekt in Leber und Muskulatur nicht oder nur schwach zu beobachten. Genexpressionen der Zielgene der UPR legen sogar eine schwache Stimulation der antioxidativen Abwehr und der UPR in der Muskulatur nahe. Die Reduktion der täglichen Energiezufuhr schien zu einer Hemmung der Cholesterin-, Triglycerid- und Carnitinsynthese zu führen und den muskulären Proteinabbau zu stimulieren. Die Studie lieferte Hinweise darauf, dass durch Energierestriktion eine Abschwächung des Entzündungsgeschehens, der antioxidativen Abwehr und der UPR in der Leber erfolgte. In der Muskulatur konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Die Milchzusammensetzung und die Ferkelentwicklung wurden in allen Behandlungsgruppen nicht negativ beeinflusst. Daher könnte Fischöl eingesetzt werden können, die Tiergesundheit laktierender Sauen zu verbessern, ohne die Wurfentwicklung zu beeinträchtigen.

9 Summary

The present study dealt with the significance of the peroxisome proliferator-activated receptor α during lactation of the sow. In rats, it has been observed that during lactation down-regulation of PPAR α lead to a decreased fatty acid oxidation and reduction of thermogenesis to save energy and substrates for milk production. Furthermore PPAR α -activators led to a disruption of these adaptation mechanisms which resulted in a drop in milk fat synthesis and development of the offspring. Recently various adaptation mechanisms of metabolic pathways of the sow during lactation have been described which showed that adaptation reactions occurring in the rat do not occur in the sow. On the contrary occurs an activation of PPAR α and stimulation of the dependent pathways during lactation in the sow. The aim of the present study was to investigate the influence of lactation on the triglyceride and cholesterol metabolism and muscle protein degradation. Moreover it was recently shown that during lactation of the sow occurs an adaptation-related inflammatory response in the liver. Because of this it should be investigated whether changes in the unfolded protein response are caused by the presence of inflammation. Furthermore it was the aim of the study to investigate by synthetic (clofibrate) or nutritional (fish oil) agonist of PPAR α or by a physiological situation that leads to a PPAR α activation (energy restriction) whether the adaptation mechanisms of metabolism of the sow during lactation are disturbed by PPAR α -stimulation like in rats resulting in an impairment of the piglet development. In addition, the effects of the treatments on adaptation-related inflammatory response and cellular adjustment mechanisms (Nrf2, UPR) were examined.

For this purpose two experiments were performed. In the first experiment piglets were removed from 10 of 20 pregnant sows after farrowing who stopped milk production in the following and served as non-lactating control group. In the second experiment groups of 10 lactating sows received either a basal diet (control group), or the same diet supplemented with 50 g of fish oil (fish oil group) or 2 g clofibrate (clofibrate group) per kg or received the basal diet that was reduced in quantity so that the sows received only 75% of their daily energy needs (energy restriction group).

The results provide evidence that both the triglyceride and cholesterol metabolism as well as the muscular protein degradation were not affected by lactation and that a stimulation of the UPR is present during lactation.

Due to the different treatments with the intention of a PPAR α activation only clofibrate could result in a moderate stimulation of PPAR α in liver and muscle. Fish oil and energy

restriction showed no effects in this case. Moreover gene expressions suggested that during lactation fish oil stimulated muscular protein degradation, inhibited triglyceride synthesis and the inflammatory process and the UPR in the liver was attenuated. The results of the treatment with clofibrate suggest that by this treatment there was a stimulation of carnitine metabolism, cholesterol synthesis and degradation of muscle protein during lactation. However, an anti-inflammatory effect in the liver and muscles were not or only weakly observed. Gene expressions of the target genes of the UPR even suggest a weak stimulation of antioxidant defence and the UPR in the muscles. The reduction of daily energy intake seemed to lead to an inhibition of synthesis of cholesterol, triglycerides and carnitine and stimulate the muscle protein degradation. The study provided evidence that energy restriction attenuates inflammatory response, antioxidant defence and the UPR in the liver. In the muscle this effect was not observed.

The milk composition and piglet development were not adversely affected in all treatment groups. Therefore fish oil could be used to improve animal health of lactating sows without compromising litter development.

10 Literaturverzeichnis

- Adlouni, A., Ghalim, N., Benslimane, A., Lecerf, J.M., Saile, R. (1997):** Fasting during Ramadan induces a marked increase in high-density lipoprotein cholesterol and decrease in low-density lipoprotein cholesterol. *Ann Nutr Metab* 41 (4), 242–249.
- Attaix, D., Combaret, L., Kee, A.J., Taillandier, D. (2003):** Mechanisms of ubiquitination and proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle. In J. Zempleni, H. Daniel (Eds.): *Molecular nutrition*. Wallingford: CABI, 219–235.
- Attaix, D., Ventadour, S., Codran, A., Bechet, D., Taillandier, D., Combaret, L. (2005):** The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays Biochem* 41, 173–186.
- Auboeuf, D., Rieusset, J., Fajas, L., Vallier, P., Frering, V., Riou, J.P., Staels, B., Auwerx, J., Laville, M., Vidal, H. (1997):** Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46 (8), 1319–1327.
- Aufenanger, J., Kattermann, R. (1995):** Klinisch Chemische Meßgröße: Freie Fettsäuren (FFS). In Helmut Greiling, Axel M. Gressner, Torsten Arndt (Eds.): *Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie*. 3rd ed. Stuttgart [etc.]: Schattauer, 319–320.
- Auldist, D.E., Carlson, D., Morrish, L., Wakeford, C.M., King, R.H. (2000):** The influence of suckling interval on milk production of sows. *J. Anim. Sci.* 78 (8), 2026–2031.
- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A., Karin, M. (1995):** Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270 (5234), 286–290.
- Aurich, C., von Engelhardt, W. (Eds.) (2010):** *Physiologie der Haustiere*. 3rd ed. Stuttgart: Enke.
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., Maratos-Flier, E. (2007):** Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 5 (6), 426–437.
- Baeuerle, P.A. (1994):** Function and Activation of NF-Kappa B in the Immune System. *Annual Review of Immunology* 12 (1), 141–179.

- Baird, L., Dinkova-Kostova, A.T. (2011):** The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 85 (4), 241–272.
- Balz, M., Schulte E., Thier H.P (1993):** Simultaneous Determination of Tocopherol Acetate, Tocopherols and Tocotrienols by HPLC with Fluorescence Detection in Foods. *Fat Sci. Technol.* 95, 215–220.
- Barbera, M.J., Schluter, A., Pedraza, N., Iglesias, P., Villarroya, F., Giralt, M. (2000):** Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha Activates Transcription of the Brown Fat Uncoupling Protein-1 Gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *Journal of Biological Chemistry* 276 (2), 1486–1493.
- Barnes, P.J. (1997):** Nuclear factor- κ B. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (6), 867–870.
- Barral, J.M., Broadley, S.A., Schaffar, G., Hartl, F. (2004):** Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15 (1), 17–29.
- Bassler, R. (Ed.) (1976):** Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. 3rd ed. Darmstadt: VDLUFA-Verlag (Methodenbuch, 3).
- Berger, J., Moller, D.E. (2002):** The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53 (1), 409–435.
- Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J.H., West, A.B., Ron, D. (2001):** Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *J. Clin. Invest.* 107 (5), 585–593.
- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan K. *et al.* (2001):** Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science* 294 (5547), 1704–1708.
- Braissant, O. (1996):** Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137 (1), 354–366.
- Braun, S., Hanselmann, C., Gassmann, M.G., auf dem Keller, U., Born-Berclaz, C., Chan, K., Kan, Y.W., Werner, S. (2002):** Nrf2 Transcription Factor, a Novel Target of Keratinocyte Growth Factor Action Which Regulates Gene Expression and Inflammation in the Healing Skin Wound. *Molecular and Cellular Biology* 22 (15), 5492–5505.

- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., Shore, G.C. (2003):** Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22 (53), 8608–8618.
- Brendemuhl, J.H., Lewis, A.J., Peo, E.R.Jr. (1989):** Influence of energy and protein intake during lactation on body composition of primiparous sows. *J Anim Sci* 67 (6), 1478–1488.
- Brown, A.J., Sun, L., Feramisco, J.D., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (2002):** Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell* 10 (2), 237–245.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1997):** The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell* 89 (3), 331–340.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1999):** A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (20), 11041–11048.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L. et al. (2009):** The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55 (4), 611–622.
- Butte W. J. (1983):** Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulfonium hydroxide for transesterification. *Journal of Chromatography* (261), 142–145.
- Cai, D., Frantz, J., Tawa, N.E., Melendez, P.A., Oh, B.-C., Lidov, H.G., Hasselgren, P.-O., Frontera, W.R., Lee, J., Glass, D.J. et al. (2004):** IKK β /NF- κ B Activation Causes Severe Muscle Wasting in Mice. *Cell* 119 (2), 285–298.
- Calder, P.C. (2012):** The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Mol Nutr Food Res* 56 (7), 1073–1080.
- Calder, P.C., Grimble, R.F. (2002):** Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 3, S14-9.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., Ron, D. (2002):** IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415 (6867), 92–96.
- Capuco, A.V., Akers, R.M. (2009):** The origin and evolution of lactation. *J. Biol.* 8 (4), 37–37.

- Carter, A.L., Abney, T.O., Lapp, D.F. (1995):** Biosynthesis and metabolism of carnitine. *J Child Neurol* 10 Suppl 2, S3-7.
- Catignani, G.L., Bieri, J.G. (1983):** Simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin Chem* 29 (4), 708–712.
- Cernuda-Morollon, E. (2001):** 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 Inhibition of NF-kappa B-DNA Binding through Covalent Modification of the p50 Subunit. *Journal of Biological Chemistry* 276 (38), 35530–35536.
- Chandrasekar, B., Nelson, J.F., Colston, J.T., Freeman, G.L. (2001):** Calorie restriction attenuates inflammatory responses to myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (5), H2094-102.
- Chen, X.-L. (2006):** Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 290 (5), H1862.
- Cheon, Y., Nara, T., Band, M., Beever, J., Wallig, A., Nakamura, M. (2005):** Induction of overlapping genes by fasting and a peroxisome proliferator in pigs: evidence of functional PPAR in nonproliferating species. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288 (6), R1525.
- Cho, H.-Y. (2004):** The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis. *The FASEB Journal*.
- Cho, H.-Y., Jedlicka, A.E., Reddy, Sekhar P. M., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Zhang, L.-Y., Kleeberger, S.R. (2002):** Role of NRF2 in Protection Against Hyperoxic Lung Injury in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26 (2), 175–182.
- Clément, K., Viguerie, N., Poitou, C., Carette, C., Pelloux, V., Curat, C.A., Sicard, A., Rome, S., Benis, A., Zucker, J.-D. et al. (2004):** Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J.* 18 (14), 1657–1669.
- Clowes, E.J., Aherne, F.X., Baracos, V.E. (2005):** Skeletal muscle protein mobilization during the progression of lactation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288 (3), E564-72.
- Cnop, M., Fougelle, F., Velloso, L.A. (2012):** Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* 18 (1), 59–68.

- Coccurello, R., Caprioli, A., Bellantuono, S., D'Amato, F.R., Conti, R., Giannessi, F., Borsini, F., Moles, A. (2010):** Effects of the increase in neuronal fatty acids availability on food intake and satiety in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 210 (1), 85–95.
- Cordero, G., Isabel, B., Morales, J., Menoyo, D., Piñeiro, C., Daza, A., Lopez-Bote, C.J. (2011):** Conjugated linoleic acid (CLA) during last week of gestation and lactation alters colostrum and milk fat composition and performance of reproductive sows. *Animal Feed Science and Technology* 168 (3-4), 232–240.
- Cox, J.S., Chapman, R.E., Walter, P. (1997):** The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Molecular Biology of the Cell* 8 (9), 1805–1814.
- Cox, J.S., Shamu, C.E., Walter, P. (1993):** Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73 (6), 1197–1206.
- Cox, J.S., Walter, P. (1996):** A Novel Mechanism for Regulating Activity of a Transcription Factor That Controls the Unfolded Protein Response. *Cell* 87 (3), 391–404.
- Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W., Diehl, J.A. (2004):** The Keap1-BTB Protein Is an Adaptor That Bridges Nrf2 to a Cul3-Based E3 Ligase: Oxidative Stress Sensing by a Cul3-Keap1 Ligase. *Molecular and Cellular Biology* 24 (19), 8477–8486.
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., Diehl, J.A. (2003):** Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Molecular and Cellular Biology* 23 (20), 7198–7209.
- Cummings, C.J. (2001):** Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Human Molecular Genetics* 10 (14), 1511–1518.
- Dardevet, D., Sornet, C., Taillandier, D., Savary, I., Attaix, D., Grizard, J. (1995):** Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. *J. Clin. Invest.* 96 (5), 2113–2119.
- Darragh, A., Moughan, P. (1998):** The Composition of Colostrum and Milk. In Verstegen, M.W.A., Moughan, P.J., Schrama, J.W. (Eds.): *The Lactating sow*. Wageningen, Netherlands: Wageningen Pers., 3-22.

- De Sousa-Coelho, A.L., Marrero, P.F., Haro, D. (2012):** Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. *Biochem J* 443 (1), 165–171.
- Delangre, T., Vernier, L., Moore, N., Mihout, B. (1990):** Acute rhabdomyolysis during treatment with ciprofibrate. *Presse Med* 19 (39), 1811–1812.
- Delerive, P. (1999):** Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha Negatively Regulates the Vascular Inflammatory Gene Response by Negative Cross-talk with Transcription Factors NF-kappa B and AP-1. *Journal of Biological Chemistry* 274 (45), 32048–32054.
- Delerive, P. (2000):** Induction of Ikappa Balpha Expression as a Mechanism Contributing to the Anti-inflammatory Activities of Peroxisome Proliferator-activated Receptor-alpha Activators. *Journal of Biological Chemistry* 275 (47), 36703–36707.
- Delerive, P. (2002):** DNA Binding-Independent Induction of I B Gene Transcription by PPAR. *Molecular Endocrinology* 16 (5), 1029–1039.
- Deng, J., Lu, P.D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Sonenberg, N., Harding, H.P., Ron, D. (2004):** Translational Repression Mediates Activation of Nuclear Factor Kappa B by Phosphorylated Translation Initiation Factor 2. *Molecular and Cellular Biology* 24 (23), 10161–10168.
- Desvergne, B. (1999):** Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews* 20 (5), 649–688.
- Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vazquez, M., Gonzalez, F.J., Wahli, W. (1996):** The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384 (6604), 39–43.
- Dewey, K.G. (1997):** Energy and protein requirements during lactation. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 19–36.
- Ding, S.T., Schinckel, A.P., Weber, T.E., Mersmann, H.J. (2000):** Expression of porcine transcription factors and genes related to fatty acid metabolism in different tissues and genetic populations. *J. Anim. Sci.* 78 (8), 2127–2134.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P. (2002):** Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (18), 11908–11913.

- Dospil, A.; Helferich, S.; Horn, F. (2005):** Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium; [Klinik, Stoffwechsel, Zellbiologie, Molekularbiologie, Signaltransduktion, Chemie]. 3., grundlegend überarb. und erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Du, J. (2000):** Glucocorticoids Induce Proteasome C3 Subunit Expression in L6 Muscle Cells by Opposing the Suppression of Its Transcription by NF-kappa B. *Journal of Biological Chemistry* 275 (26), 19661–19666.
- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., Fufelle, F. (2004):** SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86 (11), 839–848.
- Eder, K., Ringseis, R. (2010):** The role of peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional regulation of novel organic cation transporters. *European Journal of Pharmacology* 628 (1-3), 1–5.
- Eizirik, D.L., Cardozo, A.K., Cnop, M. (2008):** The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29 (1), 42–61.
- Ellgaard, L., Helenius, A. (2003):** Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (3), 181–191.
- Engelhardt, W.v.; Ahrens, F. (Eds.) (2005):** Physiologie der Haustiere. 2nd ed. Stuttgart: Enke.
- Epstein, F.H., Barnes, P.J., Karin, M. (1997):** Nuclear Factor- κ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *N Engl J Med* 336 (15), 1066–1071.
- Epstein, F.H., Mitch, W.E., Goldberg, A.L. (1996):** Mechanisms of Muscle Wasting — The Role of the Ubiquitin–Proteasome Pathway. *N Engl J Med* 335 (25), 1897–1905.
- Escher, P., Wahli, W. (2000):** Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 448 (2), 121–138.
- Espenshade, P.J. (2006):** SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *Journal of Cell Science* 119 (6), 973–976.
- Etienne, M., Dourmad, J.Y., Noblet, J. (1998):** The influence of some sow and piglet characteristics and of environmental conditions on milk production. In Verstegen, M.W.A., Moughan, P.J., Schrama, J.W. (Eds.): The Lactating sow. Wageningen, Netherlands: Wageningen Pers, 285–299.

- Etienne, M., Noblet, J., Desmoulin, B. (1985):** Mobilisation des réserves corporelles chez la truie primipare en lactation. *Reprod Nutr Dev* 25 (1B), 341–343.
- Fang, C.H., Sun, X., Li, B.G., Fischer, D.R., Pritts, T.A., Penner, G., Hasselgren, P.O. (2000):** Burn injuries in rats upregulate the gene expression of the ubiquitin-conjugating enzyme E2(14k) in skeletal muscle. *J Burn Care Rehabil* 21 (6), 528–534.
- Fernandez-Alvarez, A., Alvarez, M.S., Gonzalez, R., Cucarella, C., Muntane, J., Casado, M. (2011):** Human SREBP1c Expression in Liver Is Directly Regulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR). *Journal of Biological Chemistry* 286 (24), 21466–21477.
- Ferré, P. (2004):** The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Relationship With Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity. *Diabetes* 53 (Supplement 1), S43.
- Fischer, D., Sun, X., Gang, G., Pritts, T., Hasselgren, P.-O. (2000):** The Gene Expression of Ubiquitin Ligase E3 α Is Upregulated in Skeletal Muscle during Sepsis in Rats—Potential Role of Glucocorticoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267 (2), 504–508.
- Fisher, G.S. (1945):** Determination of Gamma-Tocopherol in Vegetable Oils. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 17 (4), 224–227.
- Flower, R.J. (1988):** Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *British Journal of Pharmacology* 94 (4), 987–1015.
- Forman, B.M., Chen, J., Evans, R.M. (1997):** Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors and. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (9), 4312–4317.
- Fruchart, J.C., Duriez, P., Staels, B. (1999):** Peroxisome proliferator-activated receptor- α activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 10 (3), 245–257.
- Gardner, B.M., Walter, P. (2011):** Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response. *Science* 333 (6051), 1891–1894.
- Geishauser, T., Leslie, K., Duffield, T., Edge, V. (1997):** Fat/protein ratio in first DHI test milk as test for displaced abomasum in dairy cows. *Zentralbl Veterinarmed A* 44 (5), 265–270.

- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE, 2006):** Ausschuss für Bedarfsnormen. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung für Schweine. 1st ed. Frankfurt am Main, Deutschland: DLG-Verlag.
- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE, 2008):** Ausschuss für Bedarfsnormen. Schätzung der Umsetzbaren Energie von Mischfuttermitteln für Schweine, *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 2008, 17: 199–204.
- Geßner, D.K., Schlegel, G., Keller, J., Schwarz, F., Ringseis, R., Eder, K. (2013):** Expression of target genes of nuclear factor E2-related factor 2 in the liver of dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *Journal of Dairy Science* 96 (2), 1038–1043.
- Geßner, D.K., Schlegel, G., Ringseis, R., Schwarz, F.J., Eder, K. (2014):** Up-regulation of endoplasmic reticulum stress induced genes of the unfolded protein response in the liver of periparturient dairy cows. *BMC Vet Res* 10, 46–46.
- Gething, M.J. (1999):** Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10 (5), 465–472.
- Ghosh, S., Karin, M. (2002):** Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle. *Cell* 109 (2), S81.
- Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B. (1998):** NF- κ B and Rel Proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16 (1), 225–260.
- Gill, J., Thomson, W. (1956):** Observations on the behaviour of suckling pigs. *The British Journal of Animal Behaviour* 4 (2), 46–51.
- Glickman, M.H., Ciechanover, A. (2002):** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82 (2), 373–428.
- Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A., Goldberg, A.L. (2001):** Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (25), 14440–14445.
- Goto, T., Takahashi, N., Kato, S., Egawa, K., Ebisu, S., Moriyama, T., Fushiki, T., Kawada, T. (2005):** Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPARalpha-expressing HepG2 hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337 (2), 440–445.

- Guo, Q., Wang, P.-R., Milot, D.P., Ippolito, M.C., Hernandez, M., Burton, C.A., Wright, S.D., Chao, Y.-s. (2001):** Regulation of lipid metabolism and gene expression by fenofibrate in hamsters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1533 (3), 220–232.
- Gutgesell, A., Ringseis, R., Schmidt, E., Brandsch, C., Stangl, G.I., Eder, K. (2009):** Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and its coactivators in liver and skeletal muscle mediates the metabolic adaptations during lactation in mice. *J. Mol. Endocrinol.* 43 (6), 241–250.
- Hahn, P. (1982):** Carnitine in the perinatal period of mammals. *Nutrition Research* 2 (2), 201–206.
- Hakim, J. (1993):** Formes réactives de l'oxygène et inflammation. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 187 (3), 286–295.
- Han, K.L., Choi, J.S., Lee, J.Y., Song, J., Joe, M.K., Jung, M.H., Hwang, J.-K. (2008):** Therapeutic potential of peroxisome proliferators--activated receptor-alpha/gamma dual agonist with alleviation of endoplasmic reticulum stress for the treatment of diabetes. *Diabetes* 57 (3), 737–745.
- Hara, A., Radin, N.S. (1978):** Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90 (1), 420–426.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., Ron, D. (2000):** Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular Cell* 6 (5), 1099–1108.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D. (1999):** Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397 (6716), 271–274.
- Haze, K., Okada, T., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., Mori, K. (2001):** Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* 355 (1), 19–19.
- He, C.H. (2001):** Identification of Activating Transcription Factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting Protein. Implication for Heme Oxygenase-1 Gene Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 276 (24), 20858–20865.

- Hendershot, L.M. (2004):** The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med* 71 (5), 289–297.
- Henneberg W., Stohmann, F. (1860, 1864):** Beiträge zur Begründung einer Rationellen Fütterung der Wiederkäuer. Praktisch-landwirthschaftliche und physiologische Untersuchungen. *Schwetschke und Sohn* (Heft 1 und 2, Braunschweig).
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1992):** The Ubiquitin System for Protein Degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61 (1), 761–807.
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1998):** The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1), 425–479.
- Hetz, C. (2012):** The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.*
- Heuer, C., Schukken, Y.H., Dobbelaar, P. (1999):** Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *J Dairy Sci* 82 (2), 295–304.
- Heuer, C., van Straalen, W.M., Schukken, Y.H., Dirkzwager, A., Noordhuizen, J. (2000):** Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. *Livestock Production Science* 65 (1-2), 91–105.
- Heuer, C., van Straalen, W.M., Schukken, Y.H., Dirkzwager, A., Noordhuizen, J. (2001):** Prediction of Energy Balance in High Yielding Dairy Cows with Test-Day Information. *Journal of Dairy Science* 84 (2), 471–481.
- Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., Stein, R.B., Eichele, G., Evans, R.M., Thaller, C. (1992):** 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68 (2), 397–406.
- Hirche, F., Fischer, M., Keller, J., Eder, K. (2009):** Determination of carnitine, its short chain acyl esters and metabolic precursors trimethyllysine and gamma-butyrobetaine by quasi-solid phase extraction and MS/MS detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (22), 2158–2162.
- Hobler, S.C., Wang, J.J., Williams, A.B., Melandri, F., Sun, X., Fischer, J.E., Hasselgren, P.O. (1999):** Sepsis is associated with increased ubiquitinconjugating enzyme E214k mRNA in skeletal muscle. *Am J Physiol* 276 (2 Pt 2), R468-73.

- Hodel, C. (2002):** Myopathy and rhabdomyolysis with lipid-lowering drugs. *Toxicology Letters* 128 (1-3), 159–168.
- Holden, P., Tugwood, J. (1999):** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha: role in rodent liver cancer and species differences. *Journal of Molecular Endocrinology* 22 (1), 1–8.
- Horton, J.D., Bashmakov, Y., Shimomura, I., Shimano, H. (1998):** Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (11), 5987–5992.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (2002):** SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109 (9), 1125–1131.
- Horton, J.D., Shimomura, L. (1999):** Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Current Opinion in Lipidology* 10 (2), 143–150.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A.D., Kaufman, R.J., Exton, J.H. (2006):** Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1 -Mediated NF- κ B Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression. *Molecular and Cellular Biology* 26 (8), 3071–3084.
- Innamorato, N.G., Rojo, A.I., García-Yagüe, A.J., Yamamoto, M., de Ceballos, María L, Cuadrado, A. (2008):** The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J. Immunol.* 181 (1), 680–689.
- Israel, A. (2010):** The IKK Complex, a Central Regulator of NF- κ B Activation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (3), a000158.
- Issemann, I., Green, S. (1990):** Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347 (6294), 645–650.
- Ito, C.Y., Kazantsev, A.G., Baldwin, A S Jr (1994):** Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Res* 22 (18), 3787–3792.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I. et al. (1997):** An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236 (2), 313–322.

- Jacobs, M.D., Harrison, S.C. (1998):** Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 95 (6), 749–758.
- Jiang, H.-Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Lu, D., Hai, T., Harding, H.P., Wang, X., Ron, D., Cavener, D.R., Wek, R.C. (2004):** Activating Transcription Factor 3 Is Integral to the Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinase Stress Response. *Molecular and Cellular Biology* 24 (3), 1365–1377.
- Jiwakanon, J., Persson, E., Dalin, A.-M. (2006):** The endometrium of the anoestrous female pig: studies on infiltration by cells of the immune system. *Reprod. Domest. Anim.* 41 (3), 191–195.
- Johnson, D.A., Amirahmadi, S., Ward, C., Fabry, Z., Johnson, J.A. (2010):** The Absence of the Pro-antioxidant Transcription Factor Nrf2 Exacerbates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Toxicological Sciences* 114 (2), 237–246.
- Jung, K.-A., Kwak, M.-K. (2010):** The Nrf2 System as a Potential Target for the Development of Indirect Antioxidants. *Molecules* 15 (10), 7266–7291.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000):** Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18 (1), 621–663.
- Kaspar, J.W., Niture, S.K., Jaiswal, A.K. (2009):** Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 47 (9), 1304–1309.
- Kaufman, R.J. (1999):** Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & Development* 13 (10), 1211–1233.
- Keates, S., Hitti, Y.S., Upton, M., Kelly, C.P. (1997):** Helicobacter pylori infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 113 (4), 1099–1109.
- Kee, A.J., Combaret, L., Tilignac, T., Souweine, B., Aurousseau, E., Dalle, M., Taillandier, D., Attaix, D. (2003):** Ubiquitin-proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats. *The Journal of Physiology* 546 (3), 765–776.
- Kerner, J., Froseth, J.A., Miller, E.R., Bieber, L.L. (1984):** A study of the acylcarnitine content of sows' colostrum, milk and newborn piglet tissues: demonstration of high amounts of isovalerylcarnitine in colostrum and milk. *J Nutr* 114 (5), 854–861.

- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., Wahli, W. (1999):** Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103 (11), 1489–1498.
- Khor, T.O., Huang, M.-T., Kwon, K.H., Chan, J.Y., Reddy, B.S., Kong, A.-N. (2006):** Nrf2-Deficient Mice Have an Increased Susceptibility to Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Cancer Research* 66 (24), 11580–11584.
- Kim, H.-J. (1999):** Fish Oil Feeding Decreases Mature Sterol Regulatory Element-binding Protein 1 (SREBP-1) by Down-regulation of SREBP-1c mRNA in Mouse Liver. A Possible Mechanism for Down-Regulation of Lipogenic Enzyme mRNAs. *Journal of Biological Chemistry* 274 (36), 25892–25898.
- Kim, J., Cha, Y.-N., Surh, Y.-J. (2010):** A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 690 (1-2), 12–23.
- King, R., Toner M.S., Dover H., Atwood C.S., Brown W.G. (1993):** The response of 1st-litter sows to dietary-protein level during lactation. *J. Anim. Sci.* (71), 2457–2463.
- Kirchgeßner, M. (2008):** Tierernährung. Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis. 12th ed. Frankfurt am Main: DLG-Verl.
- Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M. et al. (1997):** Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors and. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (9), 4318–4323.
- Kliwer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A., Evans, R.M. (1992):** Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358 (6389), 771–774.
- Klobasa, F., Werhahn, E., Butler, J.E. (1987):** Composition of sow milk during lactation. *J. Anim. Sci.* 64 (5), 1458–1466.
- Klopfstein, C., Farmer, C., Martineau G.P. (1999):** Diseases of the mammary glands and lactation problems. In Barbara E. Straw (Ed.): Diseases of swine, vol. 8. 8th ed. Oxford, Malden, MA, USA: Blackwell Science, 833–860.

- Knight, B.L., Hebbachi, A., Hauton, D., Brown, A.-M., Wiggins, D., Patel, D.D., Gibbons, G.F. (2005):** A role for PPAR α in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem. J.* 389 (2), 413–413.
- Knox, R. (2004):** Getting to 30 pigs weaned/sow/year. In Janice Margaret Murphy (Ed.): Proceedings of the London Swine Conference. Production at the leading edge : April 6th and 7th, 2005, London, Ontario. [Guelph, ON]: The Conference, 45–59.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M. (2004):** Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology* 24 (16), 7130–7139.
- Kockx, M., Gervois, P.P., Poulain, P., Derudas, B., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Princen, H.M., Kooistra, T., Staels, B. (1999):** Fibrates suppress fibrinogen gene expression in rodents via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Blood* 93 (9), 2991–2998.
- Koh, K., Kim, J., Jang, Y.J., Yoon, K., Cha, Y., Lee, H.J., Kim, J. (2011):** Transcription factor Nrf2 suppresses LPS-induced hyperactivation of BV-2 microglial cells. *Journal of Neuroimmunology* 233 (1-2), 160–167.
- Kokame, K. (2000):** Identification of ERSE-II, a New cis-Acting Element Responsible for the ATF6-dependent Mammalian Unfolded Protein Response. *Journal of Biological Chemistry* 276 (12), 9199–9205.
- König, B., Koch, A., Spielmann, J., Hilgenfeld, C., Stangl, G.I., Eder, K. (2007):** Activation of PPAR α lowers synthesis and concentration of cholesterol by reduction of nuclear SREBP-2. *Biochem. Pharmacol.* 73 (4), 574–585.
- Krey, G. (1997):** Fatty Acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic Agents Identified as Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. *Molecular Endocrinology* 11 (6), 779–791.
- Laspiur, J.P., Burton, J.L., Weber, P.S.D., Moore, J., Kirkwood, R.N., Trottier, N.L. (2009):** Dietary Protein Intake and Stage of Lactation Differentially Modulate Amino Acid Transporter mRNA Abundance in Porcine Mammary Tissue. *Journal of Nutrition* 139 (9), 1677–1684.
- Lawrence, R.A., Burk, R.F. (1976):** Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 (4), 952–958.

- Le Jossic-Corcus, C., Duclos, S., Ramirez, L.C., Zaghini, I., Chevillard, G., Martin, P., Pineau, T., Bournot, P. (2004):** Effects of peroxisome proliferator-activated receptor α activation on pathways contributing to cholesterol homeostasis in rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1683 (1-3), 49–58.
- Leakey, J.E.A., Chen, S.H., Manjgaladze, M., Turturro, A., Duffy, P.H., Pipkin, J.L., Hart, R.W. (1994):** Role of Glucocorticoids and "Caloric Stress" in Modulating the Effects of Caloric Restriction in Rodents. *Ann NY Acad Sci* 719 (1 The Aging Clo), 171–194.
- Lecker, S.H., Solomon, V., Mitch, W.E., Goldberg, A.L. (1999a):** Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr* 129 (1S Suppl), 227S-237S.
- Lecker, S.H., Solomon, V., Price, S.R., Kwon, Y.T., Mitch, W.E., Goldberg, A.L. (1999b):** Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 104 (10), 1411–1420.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Glimcher, L.H. (2003):** XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology* 23 (21), 7448–7459.
- Lee, D.-F., Kuo, H.-P., Liu, M., Chou, C.-K., Xia, W., Du, Y., Shen, J., Chen, C.-T., Huo, L., Hsu, M.-C. et al. (2009):** KEAP1 E3 Ligase-Mediated Downregulation of NF- κ B Signaling by Targeting IKK β . *Molecular Cell* 36 (1), 131–140.
- Lee, J.-M., Johnson, J.A. (2004):** An Important Role of Nrf2-ARE Pathway in the Cellular Defense Mechanism. *Journal of Biochemistry and molecular biology* 37 (2), 139–143.
- Lenaz, G. (2001):** The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 52 (3-5), 159–164.
- Lengqvist, J. (2004):** Polyunsaturated Fatty Acids Including Docosahexaenoic and Arachidonic Acid Bind to the Retinoid X Receptor Ligand-binding Domain. *Molecular & Cellular Proteomics* 3 (7), 692–703.
- Lewis, R.A., Austen, K.F., Soberman, R.J. (1990):** Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N. Engl. J. Med.* 323 (10), 645–655.
- Li, J.B., Wassner, S.J. (1984):** Effects of food deprivation and refeeding on total protein and actomyosin degradation. *Am J Physiol* 246 (1 Pt 1), E32-7.

- Li, W., Yu, S., Liu, T., Kim, J.-H., Blank, V., Li, H., Kong, A.-N.T. (2008):** Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783 (10), 1847–1856.
- Li, Y.-P., Lecker, S.H., Chen, Y., Waddell, I.D., Goldberg, A.L., Reid, M.B. (2003):** TNF-increases ubiquitin-conjugating activity in skeletal muscle by up-regulating UbcH2/E220k. *The FASEB Journal* 17 (9), 1048–1057.
- Lin, Q., Ruuska, S.E., Shaw, N.S., Dong, D., Noy, N. (1999):** Ligand Selectivity of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . *Biochemistry* 38 (1), 185–190.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001):** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25 (4), 402–408.
- Llovera, M., García-Martínez, C., Agell, N., Marzábal, M., López-Soriano, F.J., Argilés, J.M. (1994):** Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. *FEBS Letters* 338 (3), 311–318.
- Loor, J., Dann, H., Everts, R., Oliveira, R., Green, C., Guretzky, N., Rodriguez-Zas, S., Lewin, H., Drackley, J. (2005):** Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiological Genomics* 23 (2), 217–226.
- Loor, J.J., Dann, H.M., Guretzky, N.A.J., Everts, R.E., Oliveira, R., Green, C.A., Litherland, N.B., Rodriguez-Zas, S.L., Lewin, H.A., Drackley, J.K. (2006):** Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiological Genomics* 27 (1), 29–41.
- Loor, J.J., Everts, R.E., Bionaz, M., Dann, H.M., Morin, D.E., Oliveira, R., Rodriguez-Zas, S.L., Drackley, J.K., Lewin, H.A. (2007):** Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiological Genomics* 32 (1), 105–116.
- Lowell, B.B., Ruderman, N.B., Goodman, M.N. (1986):** Regulation of myofibrillar protein degradation in rat skeletal muscle during brief and prolonged starvation. *Metabolism* 35 (12), 1121–1127.
- Luci, S., Giemsa, B., Kluge, H., Eder, K. (2007a):** Clofibrate causes an upregulation of PPAR- target genes but does not alter expression of SREBP target genes in liver and adipose tissue of pigs. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (1), R70.

- Luci, S., Hirche, F., Eder, K. (2008):** Fasting and caloric restriction increases mRNA concentrations of novel organic cation transporter-2 and carnitine concentrations in rat tissues. *Ann. Nutr. Metab.* 52 (1), 58–67.
- Luci, S., König, B., Giemsa, B., Huber, S., Hause, G., Kluge, H., Stangl, G.I., Eder, K. (2007b):** Feeding of a deep-fried fat causes PPAR α activation in the liver of pigs as a non-proliferating species. *BJN* 97 (05), 872–872.
- Lundell, K. (2002):** Cloning and expression of two novel pig liver and kidney fatty acid hydroxylases cytochrome P450 (CYP)4A24 and CYP4A25. *Biochem J* 363 (Pt 2), 297–303.
- Ma, Q. (2013):** Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53 (1), 401–426.
- Ma, Q., Battelli, L., Hubbs, A.F. (2006):** Multiorgan Autoimmune Inflammation, Enhanced Lymphoproliferation, and Impaired Homeostasis of Reactive Oxygen Species in Mice Lacking the Antioxidant-Activated Transcription Factor Nrf2. *The American Journal of Pathology* 168 (6), 1960–1974.
- Ma, Y. (2003):** Delineation of a Negative Feedback Regulatory Loop That Controls Protein Translation during Endoplasmic Reticulum Stress. *Journal of Biological Chemistry* 278 (37), 34864–34873.
- Ma, Y. (2004):** Herp Is Dually Regulated by Both the Endoplasmic Reticulum Stress-specific Branch of the Unfolded Protein Response and a Branch That Is Shared with Other Cellular Stress Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 279 (14), 13792–13799.
- Mandard, S., Müller, M., Kersten, S. (2004):** Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61 (4), 393–416.
- Marx, N., Sukhova, G.K., Collins, T., Libby, P., Plutzky, J. (1999):** PPAR Activators Inhibit Cytokine-Induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Human Endothelial Cells. *Circulation* 99 (24), 3125–3131.
- McCarthy, S.D., Waters, S.M., Kenny, D.A., Diskin, M.G., Fitzpatrick, R., Patton, J., Wathes, D.C., Morris, D.G. (2010):** Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: a global approach. *Physiological Genomics* 42 (3), 188–199.
- McGarry, J.D., Brown, N.F. (1997):** The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244 (1), 1–14.

- Medina, R., Wing, S.S., Goldberg, A.L. (1995):** Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochem J* 307 (Pt 3), 631–637.
- Miller, C.W., Ntambi, J.M. (1996):** Peroxisome proliferators induce mouse liver stearyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (18), 9443–9448.
- Monsalve, F.A., Pyarasani, R.D., Delgado-Lopez, F., Moore-Carrasco, R. (2013):** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Targets for the Treatment of Metabolic Diseases. *Mediators of Inflammation* 2013 (4), 1–18.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M.J., Sambrook, J. (1993):** A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74 (4), 743–756.
- Morris, D.G., Waters, S.M., McCarthy, S.D., Patton, J., Earley, B., Fitzpatrick, R., Murphy, J.J., Diskin, M.G., Kenny, D.A., Brass, A. et al. (2009):** Pleiotropic effects of negative energy balance in the postpartum dairy cow on splenic gene expression: repercussions for innate and adaptive immunity. *Physiological Genomics* 39 (1), 28–37.
- Muchowski, P.J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E.E., Hayer-Hartl, M.K., Hartl, F.U. (2000):** Hsp70 and Hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (14), 7841–7846.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1992):** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17–27.
- Naismith, D.J. (1966):** The requirement for protein, and the utilization of protein and calcium during pregnancy. *Metabolism* 15 (7), 582–595.
- Nguyen, T. (2000):** Transcriptional Regulation of the Antioxidant Response Element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *Journal of Biological Chemistry* 275 (20), 15466–15473.
- Nishimura, M., Naito, S., Yokoi, T. (2004):** Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human Nuclear Receptor Subfamilies. *DMPK* 19 (2), 135–149.
- Noblet, J., Dourmad, J.Y., Etienne, M. (1990):** Energy utilization in pregnant and lactating sows: modeling of energy requirements. *J. Anim. Sci.* 68 (2), 562–572.

- Noblet, J., Etienne, M. (1986):** Effect of energy level in lactating sows on yield and composition of milk and nutrient balance of piglets. *J. Anim. Sci.* 63 (6), 1888–1896.
- Noblet, J., Etienne, M. (1989):** Estimation of sow milk nutrient output. *J. Anim. Sci.* 67 (12), 3352–3359.
- Nohturfft, A. (1998):** Topology of SREBP Cleavage-activating Protein, a Polytopic Membrane Protein with a Sterol-sensing Domain. *Journal of Biological Chemistry* 273 (27), 17243–17250.
- Oftedal, O.T. (2012):** The evolution of milk secretion and its ancient origins. *Animal* 6 (3), 355–368.
- Underschied, K. (1969):** Untersuchungen über Menge und Zusammensetzung der Schweinemilch und den Einfluß dieser Faktoren auf das Wachstum der Ferkel. *Wiener tierärztliche Monatsschrift* (56), 5–40.
- Pahl, H.L. (1999):** Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 18 (49), 6853–6866.
- Patel, D.D., Knight, B.L., Wiggins, D., Humphreys, S.M., Gibbons, G.F. (2001):** Disturbances in the normal regulation of SREBP-sensitive genes in PPAR α -deficient mice. *J. Lipid Res.* 42 (3), 328–337.
- Patil, C., Walter, P. (2001):** Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 13 (3), 349–355.
- Pedraza, N., Solanes, G., Iglesias, R., Vázquez, M., Giralt, M., Villarroya, F. (2001):** Differential regulation of expression of genes encoding uncoupling proteins 2 and 3 in brown adipose tissue during lactation in mice. *Biochem. J.* 355 (1), 105–105.
- Penn, D., Bobrowski, P.J., Zhang, L., Schmidt-Sommerfeld, E. (1997):** Neonatal nutritional carnitine deficiency: a piglet model. *Pediatr Res* 42 (1), 114–121.
- Perrone, C.E., Shao, L., Williams, G.M. (1998):** Effect of rodent hepatocarcinogenic peroxisome proliferators on fatty acyl-CoA oxidase, DNA synthesis, and apoptosis in cultured human and rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 150 (2), 277–286.
- Peters, J.M., Cheung, C., Gonzalez, F.J. (2005):** Peroxisome proliferator-activated receptor- α and liver cancer: where do we stand? *J. Mol. Med.* 83 (10), 774–785.

- Pluske, J., Dong, G. (1998):** Factors influencing the utilisation of colostrum and milk. In Verstegen, M.W.A., Moughan, P.J., Schrama, J.W. (Eds.): *The Lactating sow*. Wageningen, Netherlands: Wageningen Pers, 45–70.
- Pluske, J., Williams, I.H., Zak, L.J., Clowes, E.J., Cegielski, A.C., Aherne, F.X. (1998):** Feeding lactating primiparous sows to establish three divergent metabolic states: III. Milk production and pig growth. *J. Anim. Sci.* (76), 1165–1171.
- Poynter, M.E. (1998):** Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha Activation Modulates Cellular Redox Status, Represses Nuclear Factor-kappa B Signaling, and Reduces Inflammatory Cytokine Production in Aging. *Journal of Biological Chemistry* 273 (49), 32833–32841.
- Price, S.R., Bailey, J.L., Wang, X., Jurkovitz, C., England, B.K., Ding, X., Phillips, L.S., Mitch, W.E. (1996):** Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J. Clin. Invest.* 98 (8), 1703–1708.
- Price, S.R., England, B.K., Bailey, J.L., van Vreede, K., Mitch, W.E. (1994):** Acidosis and glucocorticoids concomitantly increase ubiquitin and proteasome subunit mRNAs in rat muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 267 (4), C955–C960.
- Radhakrishnan, A., Sun, L.-P., Kwon, H.J., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (2004):** Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell* 15 (2), 259–268.
- Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Müller, M., Kersten, S. (2010):** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *PPAR Research* 2010 (5), 1–20.
- Rangasamy, T. (2005):** Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *Journal of Experimental Medicine* 202 (1), 47–59.
- Rangasamy, T., Cho, C.Y., Thimmulappa, R.K., Zhen, L., Srisuma, S.S., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Petrache, I., Tudor, R.M., Biswal, S. (2004):** Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J. Clin. Invest.* 114 (9), 1248–1259.
- Rao, R.V., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E. (2004):** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11 (4), 372–380.

- Rawson, P., Stockum, C., Peng, L., Manivannan, B., Lehnert, K., Ward, H.E., Berry, S.D., Davis, S.R., Snell, R.G., McLauchlan, D. et al. (2012):** Metabolic proteomics of the liver and mammary gland during lactation. *Journal of Proteomics* 75 (14), 4429–4435.
- Rawson, R.B. (2003):** The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (8), 631–640.
- Rebouche, C.J., Lehman, L.J., Olson, L. (1986):** epsilon-N-trimethyllysine availability regulates the rate of carnitine biosynthesis in the growing rat. *J Nutr* 116 (5), 751–759.
- Rebouche, C.J., Seim, H. (1998):** Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu. Rev. Nutr.* 18, 39–61.
- Rekiel, A., Więcek, J., Beyga, K. (2011):** Analysis of the Relationship Between Fatness of Late Pregnant and Lactating Sows and Selected Lipid Parameters of Blood, Colostrum and Milk. *Annals of Animal Science* 11 (4).
- Revell, D.K., Williams, I.H., Mullan, B.P., Ranford, J.L., Smits, R.J. (1998):** Body composition at farrowing and nutrition during lactation affect the performance of primiparous sows: I. Voluntary feed intake, weight loss, and plasma metabolites. *J Anim Sci* 76 (7), 1729–1737.
- Richert, L., Price, S., Chesne, C., Maita, K., Carmichael, N. (1996):** Comparison of the induction of hepatic peroxisome proliferation by the herbicide oxadiazon in vivo in rats, mice, and dogs and in vitro in rat and human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141 (1), 35–43.
- Ringseis, R., Dathe, C., Muschick, A., Brandsch, C., Eder, K. (2007):** Oxidized fat reduces milk triacylglycerol concentrations by inhibiting gene expression of lipoprotein lipase and fatty acid transporters in the mammary gland of rats. *J Nutr* 137 (9), 2056–2061.
- Ringseis, R., Heller, K., Kluge, H., Eder, K. (2011):** mRNA expression of genes involved in fatty acid utilization in skeletal muscle and white adipose tissues of sows during lactation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 158 (4), 450–454.
- Ringseis, R., Keller, J., Lukas, I., Spielmann, J., Most, E., Couturier, A., König, B., Hirche, F., Stangl, G.I., Wen, G. et al. (2013):** Treatment with pharmacological PPAR α agonists stimulates the ubiquitin proteasome pathway and myofibrillar protein breakdown in skeletal muscle of rodents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (1), 2105–2117.

- Ringseis, R., Wege, N., Wen, G., Rauer, C., Hirche, F., Kluge, H., Eder, K. (2009):** Carnitine synthesis and uptake into cells are stimulated by fasting in pigs as a model of nonproliferating species. *J. Nutr. Biochem.* 20 (11), 840–847.
- Ristow, M., Schmeisser, S. (2011):** Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2), 327–336.
- Roglans, N., Peris, C., Verd, J.C., Alegret, M., Vázquez, M., Sánchez, R.M., Laguna, J.C. (2001):** Increase in hepatic expression of SREBP-2 by gemfibrozil administration to rats. *Biochem. Pharmacol.* 62 (6), 803–809.
- Ron, D., Walter, P. (2007):** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (7), 519–529.
- Rosenbaum, S. (2013):** Untersuchungen zu genomweiten Veränderungen der Genexpression in der Leber von Sauen während der Laktation. Dissertation (Dr. oec. troph.), Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Rosenbaum, S., Ringseis, R., Hillen, S., Becker, S., Erhardt, G., Reiner, G., Eder, K. (2012a):** Genome-wide transcript profiling indicates induction of energy-generating pathways and an adaptive immune response in the liver of sows during lactation. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 7 (4), 370–381.
- Rosenbaum, S., Ringseis, R., Hillen, S., Becker, S., Erhardt, G., Reiner, G., Eder, K. (2012b):** The stress signalling pathway nuclear factor E2-related factor 2 is activated in the liver of sows during lactation. *Acta Vet. Scand.* 54, 59–59.
- Rosenbaum, S., Ringseis, R., Most, E., Hillen, S., Becker, S., Erhardt, G., Reiner, G., Eder, K. (2013):** Genes involved in carnitine synthesis and carnitine uptake are up-regulated in the liver of sows during lactation. *Acta Vet. Scand.* 55, 24–24.
- Sadurskis, A., Kabir, N., Wager, J., Forsum, E. (1988):** Energy metabolism, body composition, and milk production in healthy Swedish women during lactation. *Am J Clin Nutr* 48 (1), 44–49.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A. (1999):** Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177 (1-4), 191–199

- Schlegel, G., Keller, J., Hirche, F., Geiszler, S., Schwarz, F.J., Ringseis, R., Stangl, G.I., Eder, K. (2012a):** Expression of genes involved in hepatic carnitine synthesis and uptake in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *BMC Vet Res* 8 (1), 28–28.
- Schlegel, G., Ringseis, R., Keller, J., Schwarz, F., Eder, K. (2012b):** Changes in the expression of hepatic genes involved in cholesterol homeostasis in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *Journal of Dairy Science* 95 (7), 3826–3836.
- Schröder, M., Kaufman, R.J. (2005a):** ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 569 (1-2), 29–63.
- Schröder, M., Kaufman, R.J. (2005b):** The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74, 739–789.
- Selvin, E., Paynter, N.P., Erlinger, T.P. (2007):** The effect of weight loss on C-reactive protein: a systematic review. *Arch. Intern. Med.* 167 (1), 31–39.
- Sen, R., Baltimore, D. (1986):** Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47 (6), 921–928.
- Serhan, C.N., Chiang, N., Van Dyke, T.E. (2008):** Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8 (5), 349–361.
- Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G., Moussignac, R.-L. (2002):** Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 196 (8), 1025–1037.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., Prywes, R. (2002):** ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Developmental Cell* 3 (1), 99–111.
- Shen, X., Zhang, K., Kaufman, R.J. (2004):** The unfolded protein response—a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 28 (1-2), 79–92.
- Sheppard, A.J., Pennington, A.T., Weihrauch, J.L. (1993):** Analysis and Distribution of Vitamin E in Vegetable Oils and Foods. In Lester Packer, Jürgen Fuchs (Eds.): Vitamin E in health and disease. New York: Dekker, CRC Press, 9–31.

- Shields, R.G., Mahan, D.C. (1983):** Effects of pregnancy and lactation on the body composition of first-litter female swine. *J. Anim. Sci.* 57 (3), 594–603.
- Shimano, H. (2001):** Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Progress in Lipid Research* 40 (6), 439–452.
- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1997):** Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99 (5), 838–845.
- Shinkai, Y., Sumi, D., Fukami, I., Ishii, T., Kumagai, Y. (2006):** Sulforaphane, an activator of Nrf2, suppresses cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *FEBS Lett.* 580 (7), 1771–1774.
- Shiota, Y., Ikeda, M., Hashimoto, F., Hayashi, H. (2003):** Effects of peroxisome proliferators gemfibrozil and clofibrate on syntheses of dolichol and cholesterol in rat liver. *J. Biochem.* 134 (2), 197–202.
- Shoelson, S.E., Herrero, L., Naaz, A. (2007):** Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology* 132 (6), 2169–2180.
- Siebenlist, U., Franzoso, G., Brown, K. (1994):** Structure, Regulation and Function of NF-kappaB. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10 (1), 405–455.
- Sigel, B., Swami, V., Can, A., Parsons, R.E., Golub, R.M., Kolecki, R., Kitamura, H. (1994):** Intimal hyperplasia producing thrombus organization in an experimental venous thrombosis model. *J Vasc Surg* 19 (2), 350–360.
- Sittler, A. (2001):** Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* 10 (12), 1307–1315.
- Sordillo, L.M., Contreras, G.A., Aitken, S.L. (2009):** Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim Health Res Rev* 10 (1), 53–63.
- Sorrells, A.D., Eicher, S.D., Harris, M.J., Pajor, E.A., Richert, B.T. (2007):** Periparturient cortisol, acute phase cytokine, and acute phase protein profiles of gilts housed in groups or stalls during gestation. *Journal of Animal Science* 85 (7), 1750–1757.
- Spaulding, C.C., Walford, R.L., Effros, R.B. (1997):** Calorie restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF1 mice. *Mech Ageing Dev* 93 (1-3), 87–94.

- Spincer, J., Rook, J.A., Towers, K.G. (1969):** The uptake of plasma constituents by the mammary gland of the sow. *Biochem J* 111 (5), 727–732.
- Spurlock, M.E., Gabler, N.K. (2008):** The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome. *J Nutr* 138 (2), 397–402.
- Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., Fruchart, J.-C. (1998a):** Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation* 98 (19), 2088–2093.
- Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebret, M., Torra, I.P., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J.-C. et al. (1998b):** Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature* 393 (6687), 790–793.
- Steiber, A., Kerner, J., Hoppel, C.L. (2004):** Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Mol Aspects Med* 25 (5-6), 455–473.
- Strack, A.M., Sebastian, R.J., Schwartz, M.W., Dallman, M.F. (1995):** Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol* 268 (1 Pt 2), R142-9.
- Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H., Sengchanthalangsy, L.L., Ghosh, G., Glass, C.K. (2000):** 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (9), 4844–4849.
- Tabas, I., Ron, D. (2011):** Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13 (3), 184–190.
- Taillandier, D., Combaret, L., Pouch, M.-N., Samuels, S.E., Bechet, D., Attaix, D. (2004):** The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 63 (2), 357–361.
- Takeuchi, Y., Yahagi, N., Izumida, Y., Nishi, M., Kubota, M., Teraoka, Y., Yamamoto, T., Matsuzaka, T., Nakagawa, Y., Sekiya, M. et al. (2010):** Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. *J. Biol. Chem.* 285 (15), 11681–11691.
- Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, H., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., Tsuji, A. (1998):** Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem* 273 (32), 20378–20382.

- Tanaka, N., Zhang, X., Sugiyama, E., Kono, H., Horiuchi, A., Nakajima, T., Kanbe, H., Tanaka, E., Gonzalez, F.J., Aoyama, T. (2010):** Eicosapentaenoic acid improves hepatic steatosis independent of PPAR α activation through inhibition of SREBP-1 maturation in mice. *Biochemical Pharmacology* 80 (10), 1601–1612.
- Tang, W.-x., Wang, L.-k., Wang, Y.-q., Zong, Z.-j., Gao, Z.-x., Liu, X.-s., Shen, Y.-j., Shen, Y.-x., Li, Y.-h. (2014):** Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation protects against endoplasmic reticulum stress-induced HepG2 cell apoptosis. *Mol Cell Biochem* 385 (1-2), 179–190.
- Temparis, S., Asensi, M., Taillandier, D., Aurousseau, E., Larbaud, D., Obled, A., Bechet, D., Ferrara, M., Estrela, J.M., Attaix, D. (1994):** Increased ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats. *Cancer Res* 54 (21), 5568–5573.
- Terrovitou, C.T., Millionis, H.J., Elisaf, M.S. (1998):** Acute Rhabdomyolysis after Bezafibrate Re-Exposure. *Nephron* 78 (3), 336–337.
- Theil, P., Labouriau, R., Sejrsen, K., Thomsen, B., Sørensen, M. (2005):** Expression of genes involved in regulation of cell turnover during milk stasis and lactation rescue in sow mammary glands. *J. Anim. Sci.* (83), 2349–2356.
- Thomas, S.E., Dalton, L.E., Daly, M.-L., Malzer, E., Marciniak, S.J. (2010):** Diabetes as a disease of endoplasmic reticulum stress. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26 (8), 611–621.
- Thrower, J.S. (2000):** Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal* 19 (1), 94–102.
- Thuerauf, D.J. (2004):** Opposing Roles for ATF6 and ATF6 in Endoplasmic Reticulum Stress Response Gene Induction. *Journal of Biological Chemistry* 279 (20), 21078–21084.
- Tiao, G., Fagan, J.M., Samuels, N., James, J.H., Hudson, K., Lieberman, M., Fischer, J.E., Hasselgren, P.O. (1994):** Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 94 (6), 2255–2264.
- Tilley, S.L., Coffman, T.M., Koller, B.H. (2001):** Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J. Clin. Invest.* 108 (1), 15–23.

- Tirasophon, W., Welihinda, A.A., Kaufman, R.J. (1998):** A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes & Development* 12 (12), 1812–1824.
- Tisdale, M.J. (2005):** The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting. *J Support Oncol* 3 (3), 209–217.
- Tkachev, V.O., Menshchikova, E.B., Zenkov, N.K. (2011):** Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry Moscow* 76 (4), 407–422.
- Todd, D.J., Lee, A.-H., Glimcher, L.H. (2008):** The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8 (9), 663–674.
- Trayhurn, P. (1983):** Decreased capacity for non-shivering thermogenesis during lactation in mice. *Pflugers Arch.* 398 (3), 264–265.
- Trayhurn, P., Douglas, J.B., McGuckin, M.M. (1982):** Brown adipose tissue thermogenesis is ‘suppressed’ during lactation in mice. *Nature* 298 (5869), 59–60.
- Trevisi, E., Amadori, M., Cogrossi, S., Razzuoli, E., Bertoni, G. (2012):** Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Research in Veterinary Science* 93 (2), 695–704.
- Tu, B.P., Weissman, J.S. (2002):** The FAD- and O₂-Dependent Reaction Cycle of Ero1-Mediated Oxidative Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Molecular Cell* 10 (5), 983–994.
- Ugochukwu, N.H., Figgers, C.L. (2007):** Caloric restriction inhibits up-regulation of inflammatory cytokines and TNF-alpha, and activates IL-10 and haptoglobin in the plasma of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* 18 (2), 120–126.
- Van den Brand, H., Heetkamp, M.J., Soede, N.M., Schrama, J.W., Kemp, B. (2000):** Energy balance of lactating primiparous sows as affected by feeding level and dietary energy source. *J. Anim. Sci.* 78 (6), 1520–1528.
- Van Dorland, H., Richter, S., Morel, I., Doherr, M., Castro, N., Bruckmaier, R. (2009):** Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92 (5), 1924–1940.

- Van Huizen, R. (2003):** P58IPK, a Novel Endoplasmic Reticulum Stress-inducible Protein and Potential Negative Regulator of eIF2alpha Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 278 (18), 15558–15564.
- Vandesompele, J., de Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., de Paepe, A., Speleman, F. (2002):** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 (7), Research 0034.1 – 0034.11
- Vattem, K.M., Wek, R.C. (2004):** Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101. (31), 11269–11274.
- Venugopal, R., Jaiswal, A.K. (1998):** Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17 (24), 3145–3156.
- Verheyen, A.J., Maes, D.G., Mateusen, B., Deprez, P., Janssens, G.P., Lange, L.d., Counotte, G. (2007):** Serum biochemical reference values for gestating and lactating sows. *The Veterinary Journal* 174 (1), 92–98.
- Voisin, L., Breuillé, D., Combaret, L., Pouyet, C., Taillandier, D., Aurousseau, E., Obled, C., Attaix, D. (1996):** Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J. Clin. Invest.* 97 (7), 1610–1617.
- Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Kosykh, V., Dallongeville, J., Fruchart, J.C., Staels, B., Auwerx, J. (1995):** Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Clin. Invest.* 96 (2), 741–750.
- Wagner, A.E., Ernst, I., Iori, R., Desel, C., Rimbach, G. (2010):** Sulforaphane but not ascorbigen, indole-3-carbinole and ascorbic acid activates the transcription factor Nrf2 and induces phase-2 and antioxidant enzymes in human keratinocytes in culture. *Exp. Dermatol.* 19 (2), 137–144.
- Wang, X.-Z. (1998):** Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *The EMBO Journal* 17 (19), 5708–5717.

- Washburn, K. E., Powell, J. G., Maxwell, C. V., Kegley, E. B., Johnson, Z., Fakler T.M. (2005):** A successful method of obtaining percutaneous liver biopsy samples of sufficient quantity for trace mineral analysis in adult swine without the aid of ultrasound. *J. Swine Health Prod.* 13, 126–130.
- Weldon, W.C., Lewis, A.J., Louis, G.F., Kovar, J.L., Giesemann, M.A., Miller, P.S. (1994):** Postpartum hypophagia in primiparous sows: I. Effects of gestation feeding level on feed intake, feeding behavior, and plasma metabolite concentrations during lactation. *J Anim Sci* 72 (2), 387–394.
- Wendt, K. (1994):** Euter- und Gesäugekrankheiten. Mit 87 Tabellen. Jena, Stuttgart: G. Fischer.
- Westermeier, C., Paulicks, B.R., Kirchgessner, M. (1998):** Futteraufnahme und Lebendmasseentwicklung von Sauen und Ferkeln während der Laktation in Abhängigkeit von der Threoninversorgung der Sau. 1. Mitteilung zum Threoninbedarf laktierender Sauen. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 79 (1-5), 33–45.
- Whitehouse, A.S., Tisdale, M.J. (2003):** Increased expression of the ubiquitin – proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF- κ B. *Br J Cancer* 89 (6), 1116–1122.
- Whitelaw, E., Williamson, D. (1977):** Effects of Lactation on Ketogenesis from Oleate or Butyrate in Rat Hepatocytes. *Biochem. J. (Biochemical Journal)* (164), 521–528.
- Williamson, D. (1986):** Regulation of metabolism during lactation in the rat. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 26 (2B), 597–603.
- Willson, T.M., Wahli, W. (1997):** Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Current Opinion in Chemical Biology* 1 (2), 235–241.
- Wing, S.S. (2005):** Control of ubiquitination in skeletal muscle wasting. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (10), 2075–2087.
- Wing, S.S., Banville, D. (1994):** 14-kDa ubiquitin-conjugating enzyme: structure of the rat gene and regulation upon fasting and by insulin. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 267 (1), E39–E48.
- Wing, S.S., Goldberg, A.L. (1993):** Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am J Physiol* 264 (4 Pt 1), E668-76.

- Woehlbier, U., Hetz, C. (2011):** Modulating stress responses by the UPRosome: A matter of life and death. *Trends in Biochemical Sciences* 36 (6), 329–337.
- Woo, Y.C., Xu, A., Wang, Y., Lam, Karen S L (2013):** Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 78 (4), 489–496.
- Woollard, D.C., Indyk, H.E., Woollard, G.A. (1999):** Carnitine in milk: a survey of content, distribution and temporal variation. *Food Chemistry* 66 (1), 121–127.
- Worgall, T.S. (1998):** Polyunsaturated Fatty Acids Decrease Expression of Promoters with Sterol Regulatory Elements by Decreasing Levels of Mature Sterol Regulatory Element-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 273 (40), 25537–25540.
- Xiao, X.Q. (2004):** Metabolic Adaptations in Skeletal Muscle during Lactation: Complementary Deoxyribonucleic Acid Microarray and Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression. *Endocrinology* 145 (11), 5344–5354.
- Xu, C. (2006):** Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (8), 1918–1926.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., Reed, J.C. (2005a):** Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115 (10), 2656–2664.
- Xu, C., Shen, G., Chen, C., G  linas, C., Kong, A.-N.T. (2005b):** Suppression of NF-  B and NF-  B-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through I  B  , IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncogene* 24 (28), 4486–4495.
- Xu, J., Nakamura, M.T., Cho, H.P., Clarke, S.D. (1999):** Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem* 274 (33), 23577–23583.
- Yahagi, N. (1999):** A Crucial Role of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 in the Regulation of Lipogenic Gene Expression by Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry* 274 (50), 35840–35844.
- Yamamoto, K. (2004):** Differential Contributions of ATF6 and XBP1 to the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress-Responsive cis-Acting Elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *Journal of Biochemistry* 136 (3), 343–350.

- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L. (2012):** Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134–134.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (2000):** ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Molecular Cell* 6 (6), 1355–1364.
- Yoshida, H. (1998):** Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *Journal of Biological Chemistry* 273 (50), 33741–33749.
- Yoshida, H. (2006):** pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *The Journal of Cell Biology* 172 (4), 565–575.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., OKADA, T., Mori, K. (2001a):** XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell* 107 (7), 881–891.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., Mori, K. (2000):** ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y (CBF) Directly to the cis-Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology* 20 (18), 6755–6767.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., Mori, K. (2001b):** Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Formation of Transcription Factor Complex ERSF Including NF-Y (CBF) and Activating Transcription Factors 6 and 6 That Activates the Mammalian Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology* 21 (4), 1239–1248.
- You, M. (2002):** Ethanol Induces Fatty Acid Synthesis Pathways by Activation of Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP). *Journal of Biological Chemistry* 277 (32), 29342–29347.
- Zabel, U., Baeuerle, P.A. (1990):** Purified human I κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 61 (2), 255–265.
- Zhang, K., Kaufman, R.J. (2008):** From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454 (7203), 455–462.

Ziccardi, P., Nappo, F., Giugliano, G., Esposito, K., Marfella, R., Cioffi, M., D'Andrea, F., Molinari, A.M., Giugliano, D. (2002): Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 105 (7), 804–809.

Zingarelli, B. (2005): Nuclear factor- κ B. *Critical Care Medicine* 33 (Suppl), S414-S416.

Zoiopoulos, P.E., Topps, J.H., English, P.R. (1983): Losses in weight and body water in sows after weaning. *Br J Nutr* 50 (1), 163–172.

11 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Eder für die Möglichkeit am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen meine Dissertation anzufertigen, für die Überlassung des interessanten Themas und sein Vertrauen in mich und meine Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Denise Geßner für ihre geduldige Hilfe und fachliche Betreuung bedanken.

Dr. Susann Rosenbaum danke ich für die Vorarbeit zur vorliegenden Arbeit. Ohne sie wäre die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner und seinem Team der Klinik für Wiederkäuer und Schweine danke ich für die aufwändige Probengewinnung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern, Doktoranden und Tierpflegern des Instituts für ihre Unterstützung, mit der sie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich stets in allen meinen Entscheidungen unterstützt haben, mir die Möglichkeit gegeben haben meine Ziele zu verfolgen und für den liebevollen Zuspruch und die Motivation im Laufe des Studiums und der Doktorarbeit.

Ich möchte mich ebenso bei meiner Schwester bedanken, die mir immer mit guten Ratschlägen und einem offenen Ohr zur Seite stand.

Von Herzen bedanke ich mich bei meinem Freund Martin Graßl für seine Geduld, seinen unermüdlichen Optimismus, die stetigen Ermutigungen und den uneingeschränkten Glauben an mich.

Ebenfalls danke ich all meinen Freunden, die mir in dieser Zeit wahre Freunde waren. Ihre konstruktive Kritik an meiner Arbeit habe ich gerne angenommen.

Ich danke der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), die das Projekt finanziell unterstützt hat (ED 70/9-1).



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6265-1



9 78 3 8359 6265 1